UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA

RAFAELA OLIVEIRA DA SILVA

Aracaju
Janeiro – 2015

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA

Dissertação de mestrado submetida à banca examinadora para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

RAFAELA OLIVEIRA DA SILVA

Orientador (as)
Professora Doutora Margarete Zanardo Gomes
Professora Doutora Juliana Cordeiro Cardoso

Aracaju
Janeiro – 2015

S586a

Silva, Rafaela Oliveira da

Avaliação da toxidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha. / Rafaela Oliveira da Silva; orientação [de] Profª. Drª Margarete Zanardo Gomes, Profª. Drª Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju: UNIT, 2015.

77 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Própolis vermelha. 2. Toxicidade aguda. 3. Isoflavonas. 4. Extrato hidroalcoólico. I. Gomes, Margarete Zanardo (orient.) II. Cardoso, Juliana Cordeiro III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 615.074:638.135

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA

Rafaela Oliveira da Silva

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À BANCA EXAMINADORA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

_____
Margarete Zanardo Gomes, Ph.D.
Orientadora

_____
Juliana Cordeiro Cardoso, Ph.D.
Orientadora

_____
Severino Matias Alencar, Ph.D.
Universidade de São Paulo (USP)

_____
Sônia Oliveira Lima, Ph.D.
Universidade Tiradentes (UNIT)

_____
Adriana Karla de Lima, Ph.D.
Universidade Tiradentes (Suplente)

_____
Ricardo Luiz Cavalcanti Albuquerque Júnior, Ph.D.
Universidade Tiradentes (Suplente)

Aracaju
Janeiro – 2015

“Não sei...
Se a vida é curta ou longa para nós,
mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocarmos o coração das pessoas.
Muitas vezes basta ser:
colo que acolhe,
braço que envolve,
palavra que conforta,
silêncio que respeita,
alegria que contagia,
lágrima que corre,
olhar que acaricia,
desejo que sacia,
amor que promove.
E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta,
nem longa demais, mas que seja intensa,
verdadeira, pura enquanto durar.
Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por seu amor incondicional. A minha família, pelo amor e apoio, em especial a meus pais Cleide e Anselmo que me ensinaram a ser a pessoa que sou. Aos professores, que muito contribuíram para minha formação. Aos amigos, que me acompanharam nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me dado sabedoria, força e perseverança para superar todas as dificuldades. Obrigada é pouco por tudo que fizeste por mim, em meio a tantas lutas me fez ser mais forte que outrora. Eu te agradeço por tudo meu Senhor, meu pai, meu melhor amigo.

Aos **meus pais**, Cleide Selma e Anselmo, pelo amor, carinho, orações e incentivo. Pelo encorajamento em momentos difíceis e reconhecimento em momentos de glória. Vocês são meus espelhos, e eu sou reflexo de uma excelente educação que vocês me proporcionaram. Pai e mãe, amo muito vocês! Agradeço também aos meus **irmãos** Wesley e Deiseana, aos meus **sobrinhos** Rafael, Isabela e Bernardo e aos meus **cunhados** Tarcio e Dayanne. Família, obrigada pelo carinho e incentivo.

A minha orientadora **Margarete Zanardo Gomes** pela competência, dedicação e paciência. Por ter me aceitado como aluna de iniciação científica e mestrado, por ter confiado em mim e acreditado no sucesso do nosso trabalho. Obrigada por ser responsável pela minha formação como pesquisadora, pessoa e aluna. Você tem meu carinho, admiração e respeito, e sempre será minha professorinha.

A minha orientadora **Juliana Cordeiro Cardoso** minha profunda admiração pela pessoa e excelente orientadora que é. Sempre dando o seu melhor para a pesquisa e com um sorriso que encanta a todos, essa é você. Agradeço de todo coração pela sua atenção, dedicação, capacidade e tempo, muitas vezes extra, para poder concluir esse trabalho. Para mim, mais que uma orientadora, é uma mãezona para seus alunos. Obrigada por tudo prof.!

Ao professor **Ricardo Luiz Cavalcante Albuquerque Júnior** pela ajuda e ensinamentos transmitidos ao longo desses anos, para que sempre o melhor fosse realizado. O senhor tem minha eterna gratidão e admiração, pois é um excelente pesquisador e professor, um verdadeiro MESTRE. Ao professor **Adriano** e a seu aluno **Bruno** pela disponibilidade em ajudar e colaborar com o trabalho.

Sou imensamente grata às alunas **Valléria** e **Ester** por terem sido extremamente dedicadas e por facilitarem o trabalho árduo, vocês são anjos que Deus colocou na minha vida. Trabalhamos em equipe e tudo deu certo! Agradeço de coração aos meus colegas de laboratório **Rafael, Reinaldo, Ailma, Genecy, Renatta, Cleveilton, Deyse, Danilo, Danielle, Talita, Sheilla, Bernadete, Roberta, Rodrigo, Neli, Gabi, Grace, Angela, Felipe, Tássia e Tamara**. As minhas amigas e conselheiras **Fani, Camila, Marismar** e **Mab.**

A todos os **colegas de mestrado** pelo convívio maravilhoso, e pelas amizades construídas, em especial à **Taíssa e Janaína**. Obrigada aos meus amigos **Evaldo, Samuel, Fábio, Fany, Dayane, Joelma** e **Ana** pelo apoio, palavras de incentivo e momentos de alegria.

Aos funcionários do Biotério: **Marcos e Max**, por tornarem possíveis os experimentos com ensaio biológico.

A **Universidade Tiradentes** por proporcionar meios de qualificação para minha vida profissional e a **Capes/Fapitec** pelo apoio financeiro.

Aos **ratos Wistar**.

E por fim, muito obrigada a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2. OBJETIVOS 17

2.1 Objetivo Geral 17

2.2 Objetivos Específicos 17

CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18

3.1 Produtos Naturais e própolis 19

3.2 Própolis vermelha 20

3.2.1 Origem botânica e composição química 20

3.2.2 Atividade biológica 23

3.3 Estudos de toxicidade 25

3.3.1 Toxicidade aguda 27

3.3.2 Toxicidade subaguda 29

CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS 33

4.1 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 34

4.1.1 Extração 34

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) 34

4.2 Aspectos Éticos 35

4.3 Animais experimentais 35

4.3.1 Condições de acondicionamento e manutenção dos animais 35

4.3.2 Preparação dos animais 36

4.4 Estudo de toxicidade oral aguda 36

4.5 Estudo de toxicidade oral subaguda 36

4.5.1 Determinação de ciclo estral 37

4.6 Exame macroscópico e histopatológico 37

4.7 Análise estatística 38

Capítulo III – RESULTADOS E DISCUSSÃO 39

5.1 Rendimento extrativo e caracterização química da própolis vermelha 40

5.2 Análise da toxicidade aguda 42

5.3 Análise da toxicidade subaguda 44

Capítulo IV – CONCLUSÕES 60

Capítulo V – REFERÊNCIAS 62

Anexos 74

A: Sinais de toxicidade

B: Comissão de ética no uso animal - CEUA

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Pg.

Quadro 1: Distribuição dos animais nos grupos para avaliação da toxicidade aguda e subaguda do EHPV. 35

Tabela 1: Sinais de toxicidade subaguda do EHPV. 45

Tabela 2: Efeito da administração oral subaguda do EHPV na massa relativa dos órgãos de ratos Wistar (massa do órgão / massa corpórea %). 51

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros hematológicos das fêmeas submetidas à administração oral do EHPV no estudo subagudo. 53

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros hematológicos dos machos submetidos à administração oral do EHPV no estudo subagudo. 54

Tabela 5: Avaliação dos parâmetros bioquímicos das fêmeas submetidas à administração oral do EHPV no estudo subagudo. 56

Tabela 6: Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos machos submetidos à administração oral do EHPV no estudo subagudo. 57

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1: Estrutura química de compostos encontrados na própolis vermelha.	23
Figura 2: Esquema segundo *Guideline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure* 420 para a classificação GHS de substâncias.	28
Figura 3: Fases do ciclo estral de ratas Wistar. A: metaestro, B: diestro, C: proestro e D: estro.	32
Figura 4: Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV). (P1) daidzeína, (P2) formononetina, (P5) biochanina A.	41
Figura 5: Avaliação da massa corpórea das ratas dos grupos controle e EHPV300 após 7 e 14 dias do início do experimento. Dados expressos em % em relação à massa inicial dos animais, n = 05/grupo (teste *t*-Student, p > 0,05).	42
Figura 6: Consumo semanal de água (mL) e ração (g) dos animais, para os grupos controle e EHPV nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg. Diferença significativa em relação ao controle, *p<0,05 e ***p <0,001, ANOVA de duas vias (tratamento e tempo) seguida do pós-teste Tukey, n=5.	46
Figura 7: Avaliação da massa corpórea de ratos. Valores expressos em porcentagem em relação ao primeiro dia de tratamento em fêmeas (A) e machos (B), ao longo de semanas. (n = 5/grupo) e as barras indicam o erro padrão da média. EHPV: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. Diferença significativa em relação ao controle *p<0,05, **p<0,01 e ***p <0,001. ANOVA de duas vias (tratamento e tempo) seguida do pós-teste Tukey.	49
Figura 8: Avaliação histopatológica do fígado, rim e baço de fêmeas e machos do grupo controle e EHPV 200 mg/kg do estudo de toxicidade subaguda do EHPV. Fígado (HE 400), rim e baço (HE 100) sem alterações histopatológicas.	59

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA PRÓPOLIS VERMELHA

Rafaela Oliveira da Silva

Estudos recentes relataram importantes atividades biológicas da própolis vermelha brasileira. No entanto, não foi realizada uma avaliação detalhada dos possíveis efeitos adversos desse produto in vivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e subaguda da administração oral do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV). A composição química do extrato foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência. O estudo foi realizado seguindo os protocolos da *Organisation of Economic Co-operation and Development.* Para avaliação da toxicidade aguda (OECD 420) foram utilizadas ratas Wistar adultas (n = 5/grupo) que receberam uma dose única de veículo (5% Tween 80 em água, grupo controle), ou 300 mg/kg do EHPV (grupo EHPV300). Estes animais foram observados durante 14 dias quanto aos sinais de toxicidade e/ou mortalidade e alteração de massa corporal. Para a avaliação da toxicidade subaguda (OECD 407), grupos de ratos machos e fêmeas (n = 5/grupo) receberam veículo ou EHPV nas doses diárias de 10, 100 e 200 mg/kg (grupos EHPV10; EHPV100 e EHPV200, respectivamente) durante 28 dias. Foram avaliados diariamente os sinais clínicos, mortalidade e ciclo estral em fêmeas. O consumo de água e alimento e alteração de massa corpórea foram avaliados semanalmente. Ao final do período, foram realizados exames bioquímicos e hematológicos. Após a eutanásia, os órgãos de interesse foram retirados para análise macroscópica e histopatológica. Na composição química do extrato foram identificadas as isoflavonas daidzeína, formononetina e biochanina A. Foi observado que o tratamento agudo com EHPV300 induziu sinais de toxicidade em 80% dos animais até o terceiro dia após a administração do extrato (respiração ofegante, sonolência, diminuição da ambulação e diarreia), mas não foram observadas alterações macroscópicas dos órgãos. O tratamento subagudo com o EHPV10 causou raros episódios de diarreia nos animais e aumento dos níveis de ureia em fêmeas. O exame hematológico mostrou diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e aumento do número de eritrócitos e da concentração de hemoglobina em machos. O grupo EHPV100 apresentou sinais de toxicidade em fêmeas (diarreia) e machos (diarreia, diminuição da ambulação e respiração ofegante). As fêmeas apresentaram aumento do consumo de água e ração, da massa corpórea, do peso do baço e dos níveis de fosfatase alcalina, com diminuição do volume corpuscular médio das hemácias (VCM). Nos machos houve aumento da massa do pulmão, aumento da quantidade de eritrócitos e da concentração de hemoglobina, com diminuição da CHCM. No grupo EHPV200 observaram-se episódios de diarreia, aumento da massa corpórea e aumento nas concentrações de sódio e do colesterol total em ambos os sexos. Nas fêmeas houve aumento da CHCM e diminuição do VCM. Nos machos observou-se aumento do consumo de água e ração, de monócitos e aumento dos níveis de proteínas totais, fosfatase alcalina, creatinina, albumina e alanina aminotransferase, com diminuição dos níveis de triglicerídeos e da quantidade de eosinófilos, além de diminuição da massa do testículo. Não foram observadas alterações macroscópicas e histopatológicas dos órgãos analisados. A regularidade do ciclo estral foi mantida no grupo controle, mas mostrou-se alterada em 40% das fêmeas do grupo EHPV10 e em 100% das fêmeas dos grupos EHPV100 e EHPV200. Os dados indicam uma possível ação tóxica da própolis vermelha, além de um efeito estrogênico associado à presença de isoflavonas.

Palavras-chave: Própolis vermelha, toxicidade, isoflavonas.

ACUTE AND SUB-ACUTE EVALUATION OF TOXICITY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF RED PRÓPOLIS

Rafaela Oliveira da Silva

Recent studies have reported important biological activities of Brazilian red propolis, but the toxicological evaluation of this product in vivo was not carried out so far. The objective of this study was to evaluate the acute and subacute toxicity of oral administration of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP). The chemical composition of the extract was analyzed by high performance liquid chromatography. The study was conducted following the guidelines of the Organisation of Economic Co-operation and Development (OECD). To evaluate the acute toxicity (OECD 420) adult Wistar rats (n = 5 / group) received a single dose of vehicle (5% Tween 80 in water), control group, or 300 mg / kg of EHPV (EHPV300). The animals were observed for 14 days for signs of toxicity and / or mortality and body weight changes. To evaluate the subacute toxicity (OECD 407), male and female rats (n = 5 / group) received vehicle or EHPV in daily doses of 10, 100 and 200 mg / kg (EHPV10 groups; EHPV100 and EHPV200, respectively) for 28 days. The clinical signs, mortality and estrous cycle in females were evaluated every day, while the consumption of water and food and body weight loss was measured weekly. At the end of the period, biochemical and hematological tests were performed. After euthanasia, the organs of interest were removed for macroscopic and histopathological analysis. The isoflavones daidzein, formononetin and biochanin A were identified in the chemical composition of the extract. It was observed that acute treatment with EHPV300 induced signs of toxicity in 80% of animals until the third day after extract administration (breathless breathing, sleepiness, decreased ambulation and diarrhea) without macroscopic changes of organs. The subacute treatment with EHPV10 caused rare episodes of diarrhea in animals and increased levels of urea in females. The hematological test showed a decrease mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and an increased in the number of red blood cells and hemoglobin concentration in males. The EHPV100 group showed signs of toxicity in females (diarrhea) and males (diarrhea, decreased ambulation and wheezing). Females showed increased consumption of water and food, body weight, spleen weight and alkaline phosphatase levels, with decreased mean corpuscular volume (MCV) of red blood cells. In males there was an increase in lung weight, increase of the quantity of erythrocytes and hemoglobin concentration, and a decreasing in MCHC. In EHPV200 group there were episodes of diarrhea, increased body mass and increase in sodium and total cholesterol in both sexes. In females, MCHC increased and the MCV decreased. In males, the consumption of water and food, monocytes, levels of total protein, alkaline phosphatase, creatinine, albumin and alanine aminotransferase increased, while triglyceride levels and the amount of eosinophils, and decrease in mass the testis. No macroscopic and histopathological changes of the organs were observed. The regularity of the estrous cycle was maintained in the control group, but was abnormal in 40% of females of EHPV10 group and in 100% of females of groups EHPV100 and EHPV200. The data indicate a possible toxic action of red propolis, and an estrogenic effect associated with the presence of isoflavones.

Keywords: Red propolis, toxicity, isoflavones.

1. INTRODUÇÃO

A própolis de coloração vermelha é encontrada no Brasil nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia (BATISTA *et al*., 2012). Por apresentar ações farmacológicas importantes, esta própolis pode representar um produto oriundo da biodiversidade do Nordeste que contribui para o desenvolvimento científico e tecnológico em nível regional e nacional. No entanto, por se tratar de um novo tipo de própolis e apresentar composição química diferente das demais (OLDONI *et al*., 2011; RIGHI *et al*., 2011; BUENO-SILVA *et al*., 2013, CAMPO FERNÁNDEZ *et al*., 2008), a segurança para consumo deste produto natural apícola deve ser adequadamente averiguada.

Estudos mostraram que extratos da própolis vermelha apresentam ação antifúngica (SIQUEIRA *et al*., 2008), citotóxica (FRANCHI *et al*., 2012), antioxidante (CABRAL *et al*., 2009; FROZZA *et al*., 2013), anticancerígena (PINHEIRO *et al*., 2014), cicatrizante (ALMEIDA *et al*., 2013; SOUZA *et al*., 2013) e antimicrobiana (BISPO JUNIOR *et al.*, 2012), por vezes superiores às de outros tipos de própolis (SIQUEIRA *et al*., 2008). Estas ações são comumente associadas a grandes quantidades de flavonoides como a rutina, liquiritigenina, daidzeína, quercetina, dalbergina, pinocembrina, biochanina A, formononetina e isoliquiritigenina em sua composição (DAUGSCH *et al*., 2007; SILVA *et al*., 2008; AWALE *et al*., 2008).

Tal singularidade química pode influenciar a atividade biológica da própolis vermelha, inclusive no que concerne aos possíveis efeitos adversos. Dessa forma, a avaliação toxicológica dos extratos da própolis vermelha é necessária, especialmente por se tratar de um produto considerado saudável, popularmente utilizado ao longo de séculos e atualmente comercializado sob o rótulo comum de “própolis” apesar das diferentes classificações, origens botânicas e composição química (KUROPATNICKI *et al*., 2013; TORETI *et al*., 2013). Neste sentido, ainda não há relatos na literatura da avaliação normatizada dos possíveis efeitos toxicológicos da administração oral de extratos da própolis vermelha alagoana.

Para a avaliação da segurança de um produto são feitos testes toxicológicos. A toxicologia é uma ciência que avalia os efeitos adversos resultantes da interação de organismos vivos com substâncias químicas e objetiva definir o potencial de novas substâncias causarem danos a saúde humana (VALADARES, 2006; MOURA *et al*., 2012). Estudos de toxicidade pré-clínicos de fitoterápicos no Brasil são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e baseiam-se principalmente nas avaliações de toxicidade aguda e de doses repetidas. A ANVISA indica o uso de metodologias como as da *Organisa-*

tion of Economic Co-operation and Development (OECD) (ANVISA, 2010), uma organização que estabelece padrões internacionais para a segurança de produtos químicos.

Portanto, considerando que a própolis vermelha pode configurar uma importante alternativa terapêutica e uma fonte potencial para a identificação de compostos bioativos com ações farmacológicas e toxicológicas ainda não elucidadas, este trabalho se propôs a avaliar a toxicidade pré-clínica aguda e subaguda da administração oral do EHPV.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade aguda e subaguda da administração oral do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a composição química do EHPV, utilizando biomarcadores específicos;

- Avaliar a toxicidade aguda do EHPV por meio da observação dos sinais clínicos, variações na massa corpórea, análise macroscópica dos órgãos e mortalidade dos animais.

- Avaliar a toxicidade subaguda do EHPV observando a mortalidade dos animais, sinais clínicos, variações na massa corpórea, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos, avaliação macroscópica, histopatológica e massa dos órgãos dos animais e o ciclo estral em fêmeas.

Capítulo I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos Naturais e própolis

Historicamente, os produtos naturais, de origem animal ou vegetal, são utilizados para fins terapêuticos e foram por um longo período os únicos recursos disponíveis para o tratamento e cura de diversas enfermidades (GRAGG *et al.*, 2013). Com o avanço da tecnologia e da indústria farmacêutica, os compostos e derivados dos produtos naturais se tornaram essenciais para descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (MISHRA; TIWARI, 2011). Além disso, a busca por tratamentos alternativos que possam substituir ou aperfeiçoar os convencionais tem fundamentado as pesquisas a partir desses insumos.

No Brasil há um grande consumo de produtos naturais, motivado em grande parte pela influência cultural e variedade de biomas o que contribui para a implantação dos mesmos nos sistemas de cuidado a saúde (OLIVEIRA *et al*., 2012). A utilização de moléculas provenientes de produtos naturais tem sido alvo de vários estudos que focam principalmente na descoberta de novos compostos químicos (KUMAR *et al*., 2014).

Os produtos naturais são ricos em substâncias químicas estruturalmente diversificadas, capazes de interagir com macromoléculas promovendo atividades biológicas diferenciadas (SCHMITT *et al*., 2011; ZHANG *et al.*, 2013). Tais características têm inspirado as pesquisas farmacêuticas na descoberta de novas substâncias e produção de medicamentos. Porém, as interações metabólicas dos subprodutos naturais no organismo podem levar a efeitos tóxicos, a depender da dose, das características do produto, do indivíduo que o consome e da quantidade utilizada. É neste contexto que se insere a importância de investigar a eficácia e a segurança dos produtos naturais, para que consumidores e profissionais da saúde tenham acesso a informações relativas ao seu uso.

A própolis é um produto natural que vem se destacando, pois, além de ser lucrativo, é também comercializado em várias partes do mundo pela indústria alimentícia. A utilização deste recurso natural causa um baixo impacto ao meio ambiente, podendo ser desenvolvida por pequenos produtores e colaborar para o desenvolvimento econômico local (OLIVEIRA *et al*., 2010). Esse produto tem potencial aplicação para o desenvolvimento de novas drogas, porém a caracterização da sua qualidade é um grande desafio, pois existem variações em relação à composição química que influenciam as atividades farmacológicas (PEREIRA *et al*., 2002; LOTTI *et al.*, 2010; SFORCIN *et al*., 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) denomina os produtos que contêm própolis como opoterápicos. Segundo o Ministério da Agricultura “Entende-se por própo-

lis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais estas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto" (ANVISA, 2005).

A palavra própolis é de origem grega *pro* (em defesa de), *polis* (cidade), que significa: "em defesa da cidade ou da colmeia" (BANKOVA *et al*., 2000). As abelhas utilizam a própolis para esterilização, impermeabilização, embalsamamento e vedação da colmeia para evitar a entrada de intrusos (BURDOCK, 1998; BANKOVA *et al*., 2000; ALMUTAIRI *et al.*, 2014).

A composição química da própolis pode variar de acordo com a flora da região, o local e época de coleta e tais características químicas influenciam suas propriedades físicas e biológicas (NUNES *et al*., 2009). Geralmente a própolis é composta de resina e bálsamo (50-60 %), ceras (30-40%), óleos essenciais e aromáticos (5-10%), pólen (5%) e outras substâncias como alumínio, cálcio, ferro, cobre, manganês, estrôncio e vitaminas B1, B2, B6, C e E. Mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras, incluindo flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis e aminoácidos (PARK *et al*., 2002; PEREIRA *et al.,* 2002; LUSTOSA *et al*., 2008; ALMUTAIRI *et al.*, 2014).

Vários estudos têm relatado ações biológicas da própolis, tais como atividade antimicrobiana (SIQUEIRA *et al*., 2008; BISPO JUNIOR *et al*., 2012;), antitumoral, hematoestimuladora e ação radioprotetora (ORŠOLIC; BAŠIC, 2005), cicatrizante (ALMEIDA *et al*., 2013), antiparasitária (MONZOTE *et al*., 2012), anti-herpes (AMOROS *et al.*, 1992) e ação hormonal (SONG *et al.*, 2002). Dentre os tipos de própolis conhecidos, a variedade vermelha foi a mais recentemente descrita e vem sendo objeto de estudo de muitas pesquisas (ALENCAR *et al.*, 2007; PICCINELLI *et al*., 2011; FRANCHI *et al*., 2012; FROZZA *et al.*, 2013).

3.2 Própolis vermelha

3.2.1 Origem botânica e composição química

A própolis brasileira pode ser classificada em 13 tipos e a variante vermelha, pertencente ao 13° grupo de própolis, tem sido objeto de estudos farmacológicos na última década (SILVA *et al*., 2008; SIQUEIRA *et al*., 2008; LIO *et al*., 2010; PICCINELLI *et al*., 2011; FRANCHI *et al*., 2012). Esse tipo de própolis pode ser encontrado no Nordeste do Brasil, nos Estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia (BATISTA *et al*., 2012).

Daugsch *et al*., (2007) observaram que as abelhas coletavam principalmente o exsudato resinoso vermelho da *Dalbergia ecastophyllum (L)* Taub para a formação da própolis vermelha brasileira. Outro estudo avaliou secreções de 20 espécies de plantas que poderi-

am ser a origem botânica da própolis vermelha alagoana e os resultados mostraram que a *D. ecastophyllum (L.)* Taub é a principal fonte desse produto natural, pois a resina da própolis e da planta em questão apresentaram altas porcentagens das mesmas isoflavonas (SILVA *et al*., 2008).

A origem botânica da própolis vermelha cubana e venezuelana foi descrita como *Clusia nemorosa* (CUESTA-RUBIO *et al*., 2002) e *Clusia scrobiculata,* respectivamente (TRUSHEVA *et al*., 2006). Porém, um estudo mais recente sugeriu a *D. ecastophyllum* como origem botânica da própolis vermelha cubana e a contribuição da resina da família Clusiaceae para formação da própolis vermelha brasileira, devido à presença de benzofenonas poliisopreniladas na mesma (PICCINELLI *et al*., 2011). Essas variações podem alterar a atividade biológica, farmacológica e toxicológica desse produto natural, uma vez que a composição química da fonte vegetal influencia as suas características químicas (CABRAL *et al*., 2009).

Em amostras da variedade vermelha do Brasil, Cuba, México e Venezuela foram identificadas substâncias como isoflavonoides, pterocarpanos, chalconas, flavonoides, benzofenonas preniladas e terpenos (LÓPEZ *et al*., 2014). Compostos como vestitol, medicarpina, formononetina, biochanina A, liquiritigenina e isoliquiritigenina são os principais compostos da própolis vermelha cubana (CUESTA-RUBIO *et al*., 2007; CAMPO FERNANDEZ *et al*., 2008; PICCINELLI *et al*., 2011).

Na própolis vermelha brasileira podem ser encontrados flavonoides (rutina, liquiritigenina*,* daidzeína, pinobanksina, quercetina*,* dalbergina, pinocembrina, biochanina A, formononetina, isoliquiritigenina, entre outros) e ácidos fenólicos (DAUGSCH *et al*., 2007; SILVA *et al*., 2008; AWALE *et al.,* 2008) (Figura 1). Substâncias como neovestitol, vestitol e isoliquiritigenina foram encontradas em amostras de própolis vermelha alagoana. Entre estes, o vestitol demonstrou a maior atividade antioxidante e a isoliquiritigenina foi a mais ativa quanto à ação antimicrobiana (OLDONI *et al.,* 2011).

Em um estudo realizado por Lopez *et al*., (2014), amostras de própolis vermelha de diferentes regiões do Brasil foram agrupadas de acordo com os íons marcadores específicos encontrados na análise química das mesmas. Amostras de Alagoas e Paraíba foram agrupadas no grupo A e as amostras de Sergipe, Cuba e o extrato da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub foram agrupadas no grupo B. No grupo A, o íon marcador na espectrometria de massa foi o m/z 601,35 (provavelmente uma benzofenona proveniente de origem botânica da família Guttiferae). Nesse grupo também foram encontradas, em todas as amostras, a formononetina e biochanina A, que são comuns à *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. Este resultado indica que pelo menos duas espécies de plantas são as principais fontes desse

produto. No grupo B os íons marcadores foram formononetina, biochanina A e pinocembrina, os mesmos marcadores da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. Esse último resultado confirma a origem botânica das amostras analisadas do grupo B. Ainda nesse estudo, o grupo A apresentou um íon marcador correspondente à fórmula molecular $C_{38}H_{50}O_6$ que pode corresponder a três compostos encontrados em amostras de própolis: gutiferona E, oblongifolina A e xantochimol (TRUSHEVA *et al*., 2006; PICCINELLI *et al*., 2011).

Finalmente, as proantocianidinas, ou taninos condensados, que não são comumente mencionados como constituintes de amostras de própolis, estão presentes em altas quantidades na própolis vermelha e estas substâncias parecem ter um alto grau de correlação com a concentração de fenóis (MAYWORM *et al*., 2014).

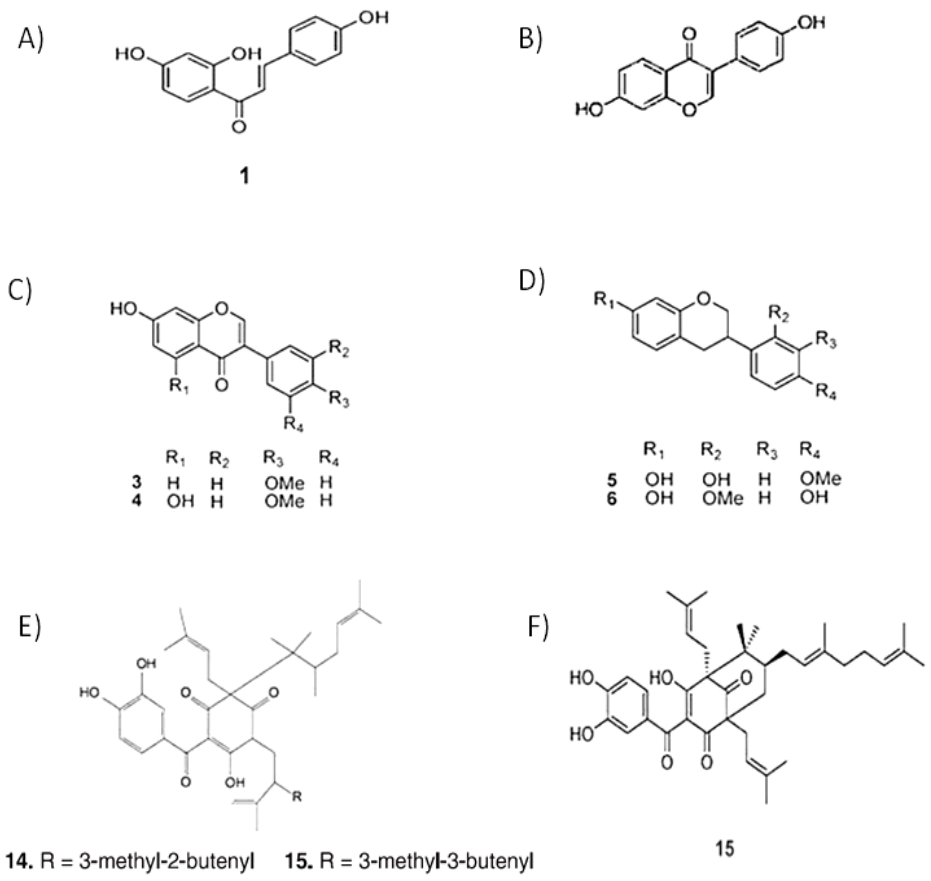


Figura 1: Estrutura química de compostos encontrados na própolis vermelha. A - isoliquiritigenina, B – daidzeína, C – formononetina e biochanina A, D – vestitol e neovestitol, E - gutiferona E e xantochimol, F- oblongifolina A. Fonte: (PICCINELLI *et al*., 2011; MORITO *et al*., 2001; TRUSHEVA *et al*., 2006).

3.2.2 Atividade biológica

Estudos que visam atividade biológica têm demonstrado que os resultados obtidos pela utilização de própolis vermelha são superiores aos encontrados para outras amostras. Por exemplo, pesquisas demonstraram uma maior atividade antifúngica da própolis vermelha em relação à variedade verde contra as espécies *Trichophyton rubrum, Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrohytes* (SIQUEIRA *et al*., 2008). Tal comportamento também pode ser observado na avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas humanas, onde o extrato etanólico da própolis vermelha foi mais eficaz quando comparado ao extrato etanólico da própolis da verde (FRANCHI *et al*., 2012).

Extratos de própolis vermelha foram capazes de inibir também o crescimento de células tumorais Hep-2, HeLa e HEK-293 (FROZZA *et al*., 2013), apresentaram citotoxicidade contra células de câncer pancreático humano PANC-1 (AWALE *et al*., 2008) e contra células tumorais tipo HeLa (ALENCAR *et al*., 2007). Substâncias como 7-hidroxi-*6*-metoxiflavanona e mucronulatol, isolados do extrato metanólico de própolis vermelha, apresentaram atividade antitumoral contra linhas celulares de carcinomas, melanomas e fibrossarcomas (LI *et al*., 2008).

Cabral *et al*., (2009) observaram uma melhor atividade antioxidante de sub-frações de uma amostra de própolis alagoana quando comparado a frações e ao extrato etanólico, relacionada à quantidade de compostos fenólicos. Estes achados indicam que componentes específicos estão relacionados à ação antioxidante. Neste sentido, a própolis vermelha tem compostos que são conhecidos por possuir propriedades antioxidantes, tais propriedades podem ser de suma importância para atividade anticancerígena (FROZZA *et al*., 2013; RIGHI *et al*., 2011). Pinheiro *et al*. (2014) observaram que a administração do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira na dose 100mg/kg modificou a formação, diferenciação e progressão de carcinoma de células escamosas na pele de murinos. Tais dados sugerem um efeito modulador na carcinogênese dérmica quimicamente induzida.

O extrato etanólico da própolis vermelha, assim como suas frações hexânicas, clorofórmicas e acetanólicas demonstrou atividade antimicrobiana frente a cepas gram-positivas, gram-negativas e fúngicas. A fração acetanólica parece ser a mais eficaz, devido a sua ação de 100% de atividade antimicrobiana em cepas testadas (BISPO JUNIOR *et al*., 2012). Os isoflavanóides vestitol e principalmente o neovestitol, substâncias isoladas da própolis vermelha, também demostraram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus, Staphylococcus aureus e Actinomyces naeslundii* (BUENO-SILVA *et al*., 2013). Por outro lado, fungos como *Candida albicans* e bactérias gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* têm demonstrado uma maior resistência a esse produto natural (RIGHI *et al*., 2011; MONZOTE *et al*., 2012).

Em adição, estudos têm testado os efeitos da própolis vermelha no processo de cicatrização (BATISTA *et al*., 2012; ALMEIDA *et al*., 2013; SOUZA *et al*., 2013). Esse produto apícola provavelmente modula a dinâmica da evolução da inflamação e o processo de deposição de colágeno, fatores que podem melhorar a cicatrização (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al*., 2009; ALMEIDA *et al*., 2013).

Outras atividades biológicas foram testadas, como atividade antiaterogênica e antiangiogênica. Polifenóis presentes na própolis vermelha podem reduzir lesões ateroscleróticas, modulando fatores angiogênicos e inflamatórios (DALEPRANE *et al*., 2012). Além dis-

so, a própolis vermelha foi mais efetiva quanto à atividade anti-inflamatória quando comparada com a variedade verde, em modelo de edema induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton (ABREU, 2008). Vale destacar que compostos como vestitol e neovestitol, encontrados nesse tipo de própolis, apresentaram atividade anti-inflamatória (BUENO-SILVA *et al*., 2013).

3.3 Estudos de toxicidade

A própolis é um produto natural usado há séculos pelo homem e o interesse pelas suas ações biológicas tem motivado pesquisas científicas em todo o mundo. A sua aplicabilidade na indústria farmacêutica, de cosméticos e de alimentos é uma crescente e esse produto natural vem sendo usado como princípio ativo em vários produtos. Lustosa *et al*. (2008) constataram a existência de mais de noventa produtos a base de própolis disponíveis no mercado brasileiro, como cápsulas, condicionador, xampu, sabonete, batom, bala, chá, protetor solar, gel pós barba, creme, pomada, entre outros.

Os opoterápicos que apresentam indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamentos específicos segundo a Resolução-RDC nº 132, de 29 de maio de 2003, D.O.U. de 02/10/2003 (ANVISA, 2005) e a maioria dos produtos à base de própolis comercializados no Brasil possui registro (BRASIL, 2001). Os limites para a fixação de identidade e qualidade da própolis são preconizados pelo Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Porém, em função de uma menor restrição e exigências sobre a toxicidade da própolis enquanto alimento, a maioria dos produtores opta por comercializá-la dessa forma, facilitando sua introdução no mercado.

De acordo com nota técnica da Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos (CATEF):

> "Para produtos de uso tópico com as seguintes indicações de uso: anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante, não serão exigidos estudos de comprovação de eficácia. Para outras indicações não derivadas de uso tradicional e para associações que envolvam própolis e extratos vegetais (ativos), deverá ser apresentado um dos itens a seguir:
>
> 1) Comprovação clínica (Fase III) do efeito terapêutico e da segurança de uso para a própolis específica** que é utilizada no produto ou na associação.
> 2) A comprovação da eficácia e da segurança de uso também poderá ser apresentada por meio de literatura científica indexada em bases de dados com estudos realizados com a própolis específica objeto do produto a ser registrado. Serão necessários, no mínimo, oito estudos, englobando ensaios clínicos e de segurança de uso do produto.

> **A designação própolis específica significa a própolis coletada na mesma região geográfica delimitada. Os estudos com a própolis específica só serão válidos para produtos nela baseados" (CATEF, 2005).

Cabe ressaltar que não foram realizados estudos detalhados sobre a toxicidade da própolis vermelha específica conforme a definição da CATEF.

Toxicologia é a ciência que tem como objeto de estudo os efeitos adversos causados pela interação entre as substâncias químicas e os organismos vivos ou sistemas biológicos (MOURA *et al*., 2012). Seu objetivo é definir o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana (VALADARES, 2006).

O estudo toxicológico pré-clínico de uma substância é de suma importância para o uso seguro da mesma na saúde humana e ambiental, pois visa à caracterização dos efeitos tóxicos resultantes de sua administração. Tais estudos são exigidos para registro e comercialização de produtos (CAZARIN *et al*., 2004; ALMEIDA, 2006). De acordo com os princípios da toxicologia, toda substância pode ser tóxica, dependendo da dose administrada ou absorvida, do tempo e frequência de exposição e das vias de administração (ALMEIDA, 2006).

No Brasil, estudos de toxicidade pré-clínicos de fitoterápicos atualmente são regulamentados pela RESOLUÇÃO-RE n. 90 de 16 de março de 2004. A ANVISA procura, através desta resolução, padronizar os ensaios toxicológicos de produtos de origem natural, estabelecendo como ensaios: a avaliação da toxicidade aguda, de doses repetidas e estudo especial de genotoxicidade indicado em casos de uso contínuo ou prolongado de medicamento em humanos. Para avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico, além de cumprir tais testes, são necessários testes de sensibilização dérmica, irritação cutânea e irritação ocular (ANVISA, 2004).

Os protocolos da *Organisation of Economic Co-operation and Development* (OECD), são indicados pela ANVISA através do guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2010). A OECD é uma organização que estabelece padrões internacionais para a segurança dos produtos químicos. As diretrizes da OECD para os ensaios de produtos químicos de números 420 (toxicidade oral aguda) e 407 (toxicidade oral de doses repetidas de 28 dias) são métodos reconhecidos internacionalmente, eficazes e que visam a diminuição do sofrimento e número de animais experimentais, pela adesão ao movimento em prol do programa 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*). Protocolos da OECD foram utilizados em estudos anteriores para avaliação toxicológica de produtos naturais (LAGARTO *et al*., 2011; BETTI *et al*., 2012; PORTO *et al*., 2013; CHIRANTHANUT *et al*., 2013; BAKOMA *et al*., 2013).

3.3.1 Toxicidade aguda

Toxicidade aguda é definida como o efeito adverso produzido num curto período de tempo após a administração de uma dose única ou múltiplas doses de uma substância dentro de um tempo de 24 horas (BRITO, 1994; ALMEIDA, 2006). Os objetivos desse teste são: definir a toxicidade intrínseca do composto, determinar as espécies mais suscetíveis à ação do composto, identificar órgãos alvos e oferecer dados sobre o modelo e seleção de doses para estudos toxicológicos de longa duração (ALMEIDA, 2006).

Na última década, a toxicidade aguda resumia-se a determinação da DL50 (dose letal mediana). Depois de debates e discussões esse teste foi eliminado das diretrizes que conduzem a avaliação da toxicologia aguda. O problema dessa metodologia era o grande número de animais usados e o parâmetro de morte como determinante, fatores que suscitam discussões éticas quanto ao uso dos animais em experimentos (VALADARES, 2006). Por esse motivo, a reavaliação da utilização desses animais e a busca da implementação regulatória de testes alternativos tem motivado instituições em todo mundo (CAZARIN *et al*., 2004).

Na tentativa de resolver esses problemas surgiram metodologias alternativas. O *Guideline for testing of chemicals, acute oral toxicity* 420 é um protocolo que adota um procedimento reprodutível e que visa evitar a morte dos animais como critério final. Além da morte do animal, este protocolo também utiliza sinais de toxicidade como critério para estimativa da DL50, diferentemente do método tradicional utilizado por muito tempo. Comparativamente, esse protocolo utiliza menor número de animais, provoca menos sofrimento e permite classificar as substâncias de uma maneira eficaz (OECD, 2001). Porém em caso de misturas de substâncias, só é possível estimar a DL50 se houver conhecimento prévio da toxicidade aguda de algumas substâncias que compõem a mistura.

O princípio do método de estudo utiliza doses moderadamente tóxicas, evita a administração de doses que possam ser letais e usam ratas fêmeas, que apresentam sensibilidade igual ou superior aos machos em relação à ação das substâncias testadas (OECD, 2001). A sequência do teste é indicada por um diagrama de fluxo ilustrado na figura 2, presente no protocolo em questão, e é baseado em sinais de toxicidade e/ou morte dos animais. De acordo como resultado do estudo deve-se testar outras doses, já preestabelecidas, ou classificar a substância teste em um dos níveis do *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* (GHS). São considerados sinais de toxicidade alterações na pele e pelos, olhos e mucosas, alterações do sistema respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso central, alterações do comportamento, atividade motora, ocorrência de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono, entre outros.

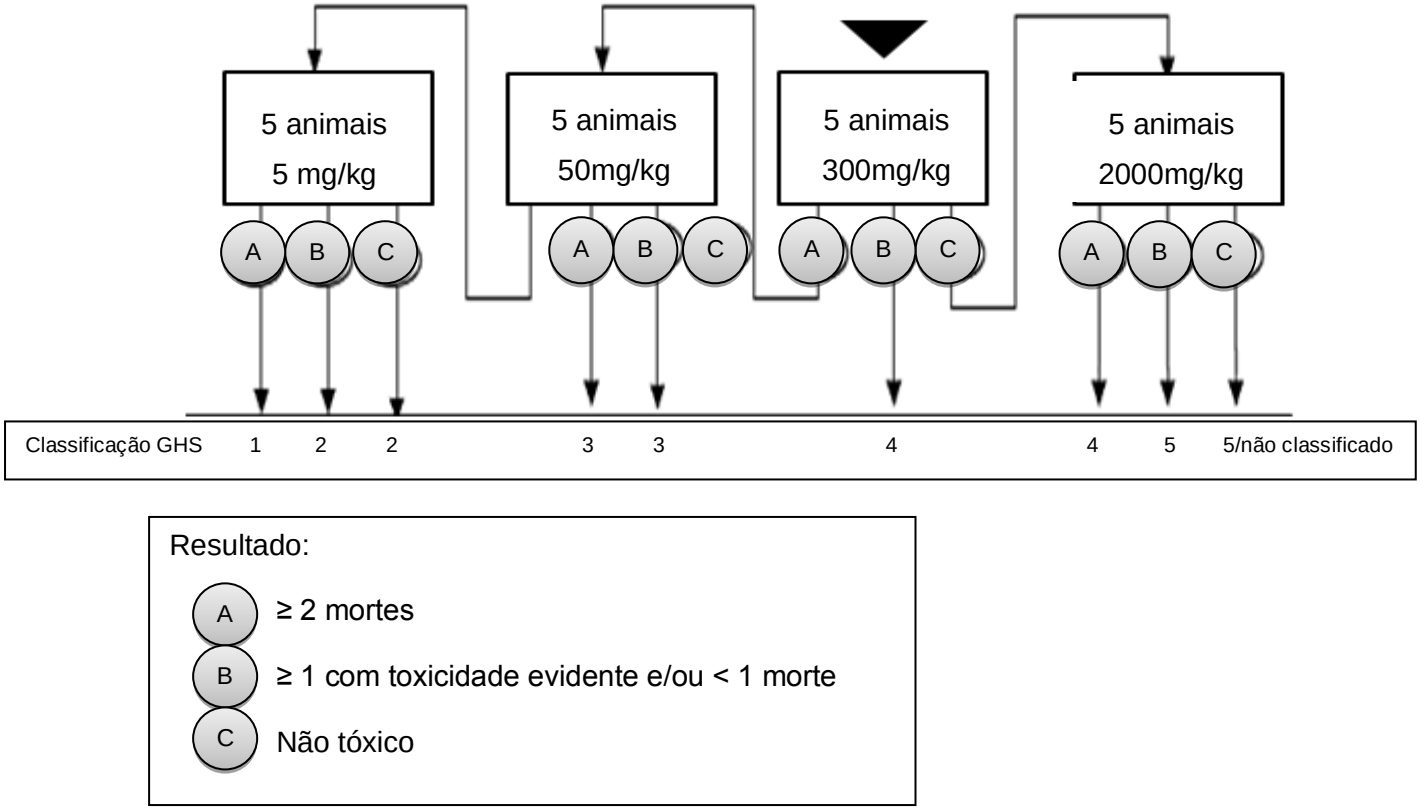


Figura 2: Esquema segundo *Guideline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure* 420 para a classificação GHS de substâncias (traduzida da OECD, 2001- *annex 3: flow chart for the main study*).

Segundo a OECD (2001) um total de cinco animais do mesmo sexo é usado para cada dose investigada e o intervalo de tempo entre a dosagem em cada nível é determinado pelo início, duração e intensidade dos sinais de toxicidade. Um período de três ou quatro dias entre a administração de diferentes doses é necessário para permitir a observação de toxicidade retardada. Os animais moribundos ou com dor, que apresentem sinais de sofrimento grave e duradouro, são eutanasiados e considerados para a interpretação dos resultados do teste, bem como os animais que morrem durante o ensaio.

Todos os animais de ensaio são submetidos à necrópsia. Os exames microscópicos dos órgãos são feitos apenas em casos de sinais tóxicos graves em animais que tenham sobrevivido 24 ou mais horas após a dosagem inicial (OECD, 2001). O método fornece informações sobre as propriedades perigosas e permite que a substância seja classificada de

acordo com o GHS, que é um sistema harmonizado de classificação e rotulagem de produtos químicos para os riscos à saúde e ambiente.

Esse sistema usa o resultado da toxicidade aguda, realizada de acordo com a OECD, para uma estimativa de DL50 e classifica substâncias puras em categoria 1, 2 ou 3 (perigoso), ou 4 ou 5 (uso com cautela). Normalmente o GHS baseia-se em dados de ratos e coelhos, com o pressuposto de que tais caracterizações são válidas para o risco humano (UNECE, 2011).

3.3.2 Toxicidade subaguda

Segundo a ANVISA (2010), os estudos de toxicidade de doses repedidas têm como objetivo caracterizar o perfil toxicológico da substância analisada pela administração repetida. A partir desse estudo é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificar órgãos alvos e observar efeitos nas funções fisiológicas, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas.

Os dados derivados de estudos de toxicidade subaguda segundo o *Guidelines for the Testing of Chemicals 407, Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents,* da OECD, permitem a caracterização da toxicidade da substância estudada, por uma indicação da relação de dose-resposta, e a observação do nível sem efeito tóxico (*No Observed Effects Levels* - NOEL). A determinação da Ingestão Diária Aceitável (IDA) de uma substância só é possível com a identificação do NOEL. A IDA é a divisão do nível de NOEL por um fator de segurança, que geralmente é 100 (MOURA *et al*., 2012).

Na toxicidade subaguda todos os animais são avaliados quanto ao ganho de massa corpórea, consumo de alimento e água, sinais clínicos, duração e reversibilidade da toxicidade, morbidade e mortalidade, alterações bioquímicas e hematológicas, peso dos órgãos, análise macroscópica e microscópica dos órgãos (OECD, 2008).

O hemograma é um exame fundamental na análise toxicológica de substâncias. Ele proporciona avaliação dos três principais componentes do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) (DALANHOL *et al*., 2010). Esse exame permite avaliar se a medula está produzindo um número suficiente de células maduras e diferentes linhagens e possibilita a avaliação da proliferação, diferenciação e aquisição de funções de cada tipo celular e seu desenvolvimento (GROTTO, 2009). O hemograma é formado por eritrograma, leucograma e plaquetograma.

O eritrograma é a análise quantitativa e qualitativa de parâmetros das hemácias no sangue periférico (MAYA, 2007). Tais parâmetros são: contagem do número de hemácias,

concentração de hemoglobina, volume globular ou hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (DIAS JUNIOR *et al*., 2006). O índice de variação do tamanho dos eritrócitos (RDW) também pode ser analisado, além de alterações na forma e coloração dos eritrócitos.

O leucograma consiste na contagem total e diferencial dos leucócitos e na análise da morfologia desses glóbulos brancos. As células leucocitárias são células de defesa e são classificadas, principalmente, como neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (MINORS, 2004). Além da identificação dessas células maduras, linfócitos atípicos, granulócitos imaturos e células blásticas podem ser detectadas na análise microscópica dessas células de defesa (GROTTO, 2009).

O plaquetograma avalia parâmetros relacionados a plaquetas. Tais parâmetros são: quantificação das plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e índice de variação do tamanho das plaquetas (PDW). O plaquetograma pode proporcionar informações relevantes sobre a atividade trombopoética (GROTTO, 2009).

As análises bioquímicas permitem avaliar a integridade funcional de alguns órgãos, pois algumas enzimas são especificas de análise de função e outras de lesão. A homeostase também pode ser avaliada, através de dosagens de carboidratos, proteínas, lipídeos, eletrólitos e da atividade de enzimas presentes no sangue. A análise da função hepática e renal é indispensável para avaliação toxicológica de uma substância, principalmente quando esta é administrada oralmente.

A análise do funcionamento hepático geralmente é realizada através da avaliação de enzimas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL) e gama glutamil transferase (GGT) (BORSA *et al*., 2006). Quando há uma elevação dessas enzimas no soro, esse evento logo é atribuído à disfunção hepática, que pode ser devido à lesão dos hepatócitos, alterações na permeabilidade da membrana do mesmo e em processos de colestase (RAMAIAH, 2007).

Os rins têm como principal função manter a homeostasia através da filtração, reabsorção e excreção de substâncias. As taxas de excreção de ureia e creatinina são os principais parâmetros de avaliação da função renal, enquanto o aumento dos níveis de proteína na urina (proteinúria) é usado como indicador de lesão renal (SODRÉ *et al*., 2007).

Outras análises importantes na avaliação da toxicidade são as análises macroscópicas e histopatológicas, estas permitem avaliar a integridade morfológica e estrutural do tecido. Tais análises consistem em mostrar os possíveis processos de necrose, inflamação, e outras alterações causadas pelas substâncias administradas em animais (MELO, 2009).

Segundo a OECD (2008) a análise macroscópica consiste em uma avaliação da superfície externa do corpo, da cavidade abdominal e dos órgãos dos animais a fim de observar alterações estruturais. A análise microscópica dos órgãos vitais permite avaliar os órgãos do organismo, principalmente aqueles em que os exames laboratoriais não conseguem avaliar pelas suas limitações (MELO, 2009).

A avaliação do ciclo estral de ratas, associada à análise histológica dos órgãos sensíveis à ação de estrogênios, pode fornecer um parâmetro da função hormonal e reprodutiva em fêmeas (OECD, 2008). A partir da obtenção do esfregaço vaginal, a citologia do epitélio da vagina é observada diariamente. A classificação das fases é feita de acordo com os tipos celulares observados no esfregaço vaginal, considerando-se as fases de proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II) (MARCONDES *et al*., 2002).

A fase do proestro se caracteriza pela preponderância de células epiteliais nucleadas, enquanto que a fase do estro é identificada pela presença dominante de células anucleadas disformes (Figura 3). No metaestro encontram-se proporção equivalente de leucócitos, células epiteliais nucleadas e células disformes, já a fase do diestro é caracterizada pelo predomínio de leucócitos (WENDLAND *et al*., 2007; SELL *et al*., 2002). O ciclo é considerado regular quando se observa regular e repetidamente uma duração de 4 a cinco dias, apresentando 2 a 3 dias de diestro, 1 dia de proestro e 1 a 2 dias de estro (ANDERSSON *et al*., 2013).

A ovulação ocorre a partir do início de proestro ao fim do estro e a duração do ciclo estral no rato fêmea é em média de 4 dias (MARCONDES *et al*., 2002). Estas observações podem proporcionar informações úteis que ajudarão na avaliação histológica dos tecidos sensíveis ao estrogênio.

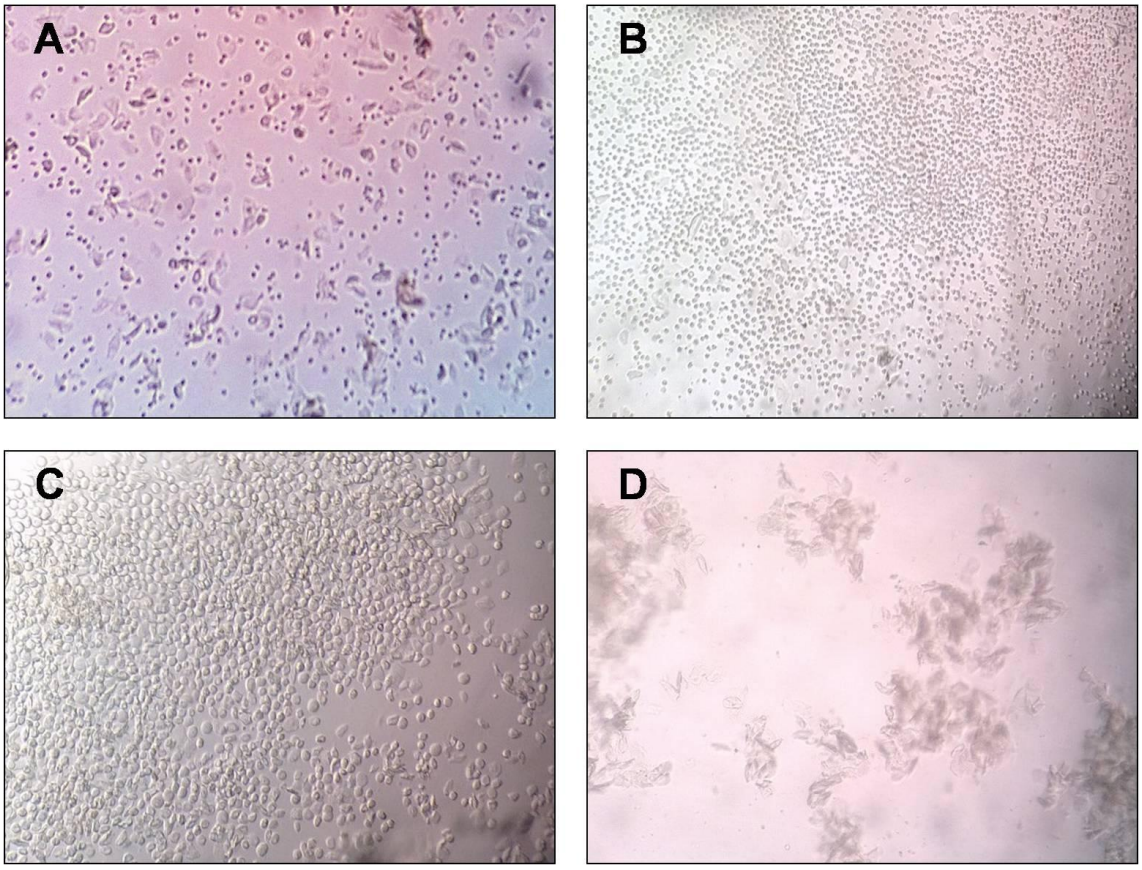


Figura 3: Fases do ciclo estral de ratas Wistar. A: metaestro, B: diestro, C: proestro e D: estro.

Capítulo II – MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e caracterização do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV)

A própolis vermelha foi proveniente da região Nordeste do Brasil, coletada em Junho de 2011 do apiário localizado na Ilha do Porto (Ilha da Lagoa Manguaba), no Município de Marechal Deodoro no Estado de Alagoas (S 9°44'36,84288" e O 35°52'3,632813").

4.1.1 Extração

A extração foi realizada em banho com ultrassom, onde 2 g de cada amostra de própolis foram colocados em tubo de ensaio estéril com rosca (tipo Falcon), extraídos com 25 mL de etanol a 70% durante 1 hora. Os extratos obtidos ao final do processamento foram filtrados e o solvente eliminado através de evaporação em capela de exaustão, obtendo o extrato seco. A ressuspensão do extrato seco foi feita em diferentes concentrações em solução aquosa com Tween 80 a 5% (MAIA – ARAÚJO *et al*., 2011).

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu®, equipado com um degaseificador DGU-20A3, um autosampler SIL-20A, duas bombas (A e B) LC-20AD, detector de arranjo de diodos SPD-M20Avp (DAD) com uma interface CBM-20A. Utilizou uma coluna analítica Phenomenex C18 de fase reversa de 250 x 4,6 mm (5 µm de tamanho de partícula). 10 mg de própolis foi diluído em 100 mL metanol / água mili-q 50:50. 5 mL desta solução foi diluído em 25 mL metanol / água mili-q 50:50, obtendo a concentração de 0.02 mg/mL, a solução foi filtrada com filtro de membrana PTFE 0,45 µm (Millipore-HVHP, MA, USA). A taxa de fluxo foi de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL. O sistema gradiente de eluição foi realizado com uma fase móvel constituída de ácido acético: (A) água mili-q 1,0% (v/v) e (B) metanol. O gradiente de eluição começou iniciando com 40% de B por 10 minutos. 50 – 55% de B por 15 minutos. 55 – 65% de B por 23 minutos. 65 – 70% por 35 minutos. 70 – 80% de B por 45 minutos. O cromatograma obtido foi analisado em um comprimento de onda de 280 nm. Os padrões de flavonoides utilizados foram: formononetina, daidzeína, biochanina A.

4.2 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa obedeceu às normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA-UNIT) em Setembro de 2013, processo nº 010913.

4.3 Animais

Foram utilizados ratos adultos machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas) da linhagem Wistar, entre 8 e 12 semanas de idade com massa corpórea no início do experimento de 260-330 g (machos) e 165-210 g (fêmeas).

Quadro 1. Distribuição dos animais nos grupos para avaliação da toxicidade aguda e subaguda do EHPV.

Testes	Controle (Veículo)	EHPV 10 mg/kg	EHPV 100 mg/kg	EHPV 200 mg/kg	EHPV 300 mg/kg
Agudo	5 F	-	-	-	5 F
Subagudo	5 F 5 M	5 F 5 M	5 F 5 M	5 F 5 M	-

F: fêmeas; M: machos.

4.3.1 Condições de acondicionamento e manutenção dos animais

Os ratos foram mantidos no Biotério da Universidade Tiradentes no campus Farolândia em Aracaju/SE, em sala com temperatura controlada (22 ± 3°C), umidade relativa do ar máxima de 70% e iluminação artificial, com sequências de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. No estudo de toxicidade aguda os animais ficaram em jejum antes da administração do extrato (restrição de alimento à noite e água *Ad libitum*). Depois de 3 horas após a administração dos tratamentos, foram disponibilizados os alimentos para os animais. Nos demais experimentos, os animais tiveram livre acesso à dieta padrão Labina ® (Purina, São Paulo, Brasil) e à água potável. Os roedores ficaram agrupados de acordo com a dose, não ultrapassando cinco por gaiola.

4.3.2 Preparação dos animais

Os animais foram marcados para permitir a identificação individualizada e mantidos nas suas gaiolas durante cinco dias antes do início do experimento para permitir uma aclimatação adequada às condições laboratoriais.

4.4 Estudo de toxicidade oral aguda

Para avaliação da toxicidade aguda foi seguido o protocolo da OECD (2001) *Guideline for Testing of Chemicals* 420. O estudo foi iniciado com cinco ratas fêmeas no grupo EHPV300, escolhidas aleatoriamente e cinco ratas fêmeas no grupo controle (água + Tween 80 5%). Os animais em jejum foram pesados antes da administração do EHPV (gavagem) e permaneceram sem alimento durante as 3 horas subsequentes. Após a administração dos tratamentos, cada animal foi observado quanto ao ganho de massa corpórea semanalmente e quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade (anexo A) durante as primeiras 24 horas, nos períodos de 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 12h e depois a cada 24 horas durante 14 dias após administração. No 15° dia os animais foram eutanasiados por anóxia em câmara de gás de CO_2 (modelo CGSCO2G – Marca Beiramar), onde receberam um fluxo de ar contendo 100% de CO_2, durante 15 minutos. A morte dos animais foi constatada através da observação da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea e então os mesmos foram submetidos à necropsia.

4.5 Estudo de toxicidade oral subaguda

Este estudo foi realizado de acordo com a o protocolo da OECD (2008), *Guidelines for the Testing of Chemicals 407, Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents*. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, cada grupo com 10 animais (5 machos e 5 fêmeas). Em jejum, o grupo controle recebeu por gavagem o veiculo (água + Tween 80 5%) e os grupos testes receberam EHPV nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg durante 28 dias (grupos EHPV10, EHPV100 e EHPV200, respectivamente), o volume do extrato líquido não excedeu a 1 mL/100 g. Todos os animais foram pesados e avaliados quanto ao consumo de água e de alimento semanalmente. As observações de sinais clínicos (anexo1), mortalidade e ciclo estral das fêmeas foram feitas diariamente. Foi feito um grupo de satélite adicional com quatro animais (dois de cada sexo) no controle e no grupo de maior dose para a observação da reversibilidade, persistência ou aparecimento tardio de efeitos tóxicos, por 14 dias após o tratamento.

Com 28 dias de tratamento os animais foram colocados em jejum por 12 h para a coleta de sangue. Os roedores foram anestesiados com xilaziana (100 mg/kg) e ketamina (14 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.) e foi coletado o sangue através da artéria mesentérica superior para a realização de hemograma (BC5380, Mindray) e dos exames bioquímicos: alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, ácido úrico, colesterol total, proteínas totais, triglicerídeos, fosfatase alcalina, ureia, creatinina, glicose, sódio, potássio e albumina (Abbott; Architect C 8000). Após a coleta, os animais foram submetidos à eutanásia por anóxia em câmara de gás de CO_2 (modelo CGSCO2G – Marca Beiramar), onde receberam um fluxo de ar contendo 100% de CO_2, durante 15 minutos. A morte dos animais foi constatada através da observação da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea e na sequência os mesmos foram submetidos à necropsia. Encéfalo, fígado, rins, pulmões, coração, estômago, baço, ovário e testículo foram pesados, avaliados macroscopicamente e preservados em formalina tamponada (10%). Foram realizados os exames histopatológicos do fígado, rim e baço somente dos animais do grupo de maior dose e controle, conforme descrição abaixo.

4.5.1 Determinação de ciclo estral

Foi avaliado diariamente o ciclo estral de todas as fêmeas. Foi colocada uma gota de soro fisiológico na vagina da rata com um conta-gotas, o soro foi depositado e aspirado e o material foi colhido sobre lâmina histológica limpa e desengordurada, previamente preparada e identificada. As fases do ciclo foram observadas em um microscópio e caracterizadas como metaestro, diestro, proestro e estro, de acordo com o tipo celular predominante (WENDLAND *et al*., 2007). Os critérios para consideração da regularidade do ciclo foram a ocorrência regular e repetida de um conjunto de duração de 4 a 5 dias correspondentes as 2 a 3 dias de diestro (metaestro e diestro), 1 dia de proestro e 1 a 2 dias de estro (ANDERSSON *et al*., 2013).

4.6 Exame macroscópico e histopatológico

Na avaliação macroscópica dos órgãos observaram-se contornos, coloração e aspectos anormais dos órgãos analisados em todos animais do estudo subagudo. Os órgãos foram retirados por dissecção, pesados e conservados em formalina tamponada a 10%. O fígado, rim e baço foram incluídos em parafina de acordo com a rotina técnica laboratorial. Uma vez inseridos em cassetes, os órgãos de interesse foram desidratados em uma série alcoólica crescente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina em forma de blocos. Os

blocos rígidos foram levados ao micrótomo para fornecer os cortes de 5 µm de espessura e logo após foram colocados sobre lâminas de vidro e levados a estufa para secarem. Foi realizada coloração com hematoxilina-eosina (HE) e as imagens foram capturadas das lâminas usando câmara de vídeo Olympus C-7070, acoplada a microscópio Olympus CX31 e avaliadas de forma cega quanto ao grupo experimental determinando a presença de alterações histopatológicas existentes.

4.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Prisma 5. As diferenças entre os dados obtidos para os diferentes tratamentos foram avaliadas por meio de teste t-Student (avaliação da massa corpórea no estudo agudo) e análise de variância (A-NOVA) de duas vias seguida do pós-teste Tukey para avaliação do consumo de água, ração e avaliação da massa corpórea ao longo do tempo no estudo subagudo. Para avaliação do peso dos órgãos e parâmetros bioquímicos e hematológicos do estudo subagudo foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey. Os valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média.

Capítulo III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento extrativo e caracterização química da própolis vermelha

Neste estudo o rendimento da extração do EHPV foi de 43,5% (± 4,9 m/v). Tal rendimento apresentou valor acima do valor mínimo de 11% especificado pelo Ministério da Agricultura. Esse parâmetro é um dos requisitos mínimos de qualidade da própolis que deve estar de acordo com a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

O cromatograma resultante da CLAE apresentou seis picos majoritários com uma boa separação em comprimento de onda de 280 nm. Os picos, denominados P1, P2, P3, P4, P5 e P6, apresentaram tempos de retenção de 15, 24, 25, 26, 27 e 38 minutos respectivamente. P1, P2 e P5 foram identificados como daidzeína (28,5 mg/g de própolis), formononetina (40,5 mg/g de própolis) e biochanina A (32,5 mg/g de própolis), respectivamente. Os picos foram identificados de acordo com o tempo de retenção de substâncias de referência (padrões), os quais foram analisados nas mesmas condições descritas anteriormente (figura 4).

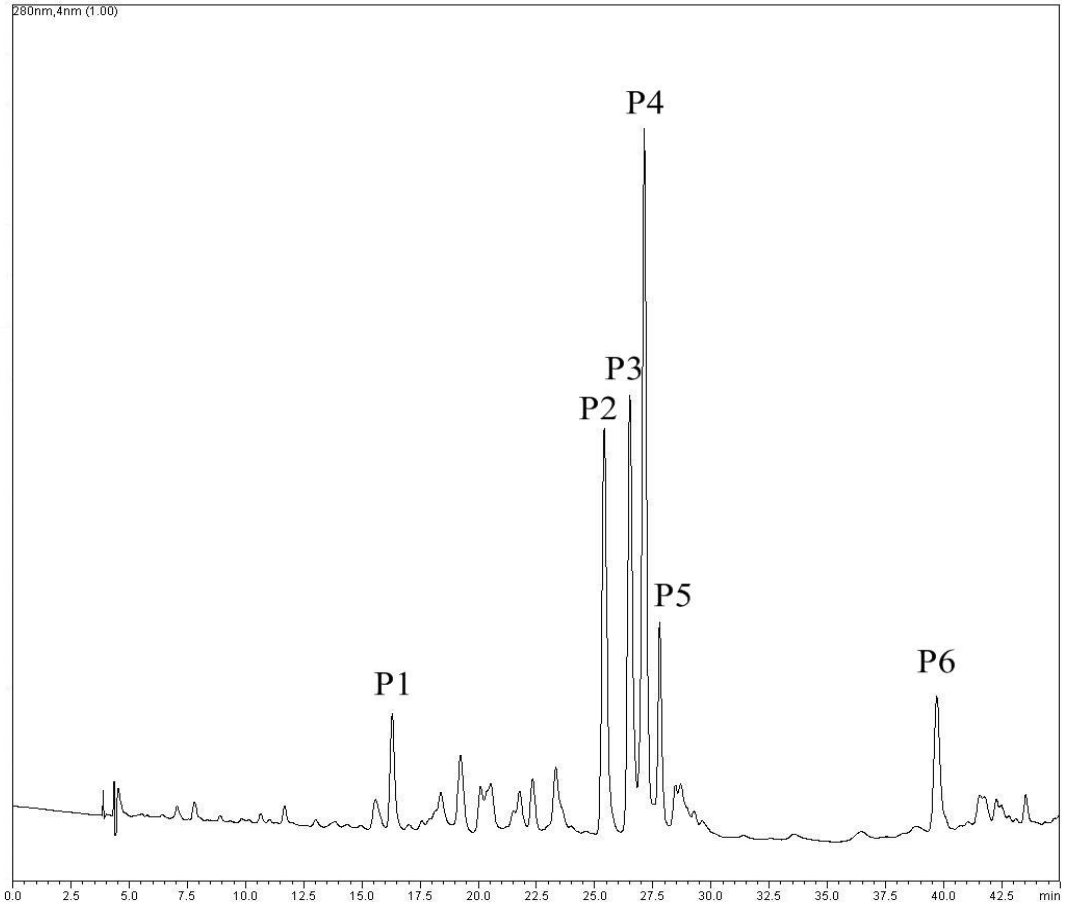


Figura 4: Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV). (P1) daidzeína, (P2) formononetina, (P5) biochanina A.

A própolis do presente estudo apresentou valores de isoflavonas maiores que os da literatura. Daugsch *et al*. (2007), encontraram no extrato etanólico de própolis vermelha coletada na região do Nordeste 0,3 mg/g de daidzeína; 0,5 mg/g de biochanina A e 10,2 mg/g de formononetina. Neste estudo os autores utilizaram amostras de diferentes locais e observaram que os extratos com atividade antibacteriana mais eficaz também apresentaram perfil de composição química com picos majoritários de formononetina. Lopez *et al*. (2014), encontraram daidzeína, biochanina A e formononetina em amostras de própolis vermelha de Alagoas, Paraíba, Sergipe e Cuba. Da mesma forma, outros estudos utilizando própolis vermelha alagoana corroboram com a presente avaliação, a daidzeína foi identificada na fração clorofórmica e no extrato etanólico de própolis vermelha proveniente de Alagoas (A-LENCAR *et al*., 2007) e a biochanina A e a formononetina também foram encontradas no extrato clorofórmico de própolis vermelha alagoana (RIGHI *et al*., 2011).

Os resultados da análise química mostraram, portanto, que a amostra utilizada no presente trabalho apresentou características químicas coerentes com o perfil da própolis de variedade vermelha. Considerando que a composição química está fortemente relacionada à ação biológica da própolis (LIO e*t al*., 2010; BATISTA *et al*., 2012), sugere-se que os dados obtidos a partir da avaliação toxicológica com esta amostra possam ser válidos para determinação da segurança da própolis vermelha brasileira proveniente da mesma região e origem botânica (Alagoas, Paraíba e Sergipe) e para utilização em estudos futuros.

5.2 Análise da toxicidade aguda do EHPV

Na avaliação pré-clínica da toxicidade aguda não ocorreu morte de animais no grupo teste EHPV300, porém 80% dos animais apresentaram alguns sinais de toxicidade até o terceiro dia após a administração única do extrato. Após este período, não foram observados sinais de toxicidade.

Os sinais clínicos observados com 15 minutos foram sonolência e diminuição da ambulação (20% dos animais). Em 30 minutos os animais apresentaram sonolência, diminuição da ambulação, respiração ofegante (40% dos animais) e tremores (20%). Após 12, 24 horas e 3 dias da administração do EHPV, 20% dos animais apresentaram diarreia. Não foram observados morte ou sinais de toxicidade no grupo controle.

Em relação ao ganho de massa corpórea, não houve diferença significativa entre os grupos controle e EHPV após 7 e 14 dias (figura 5).

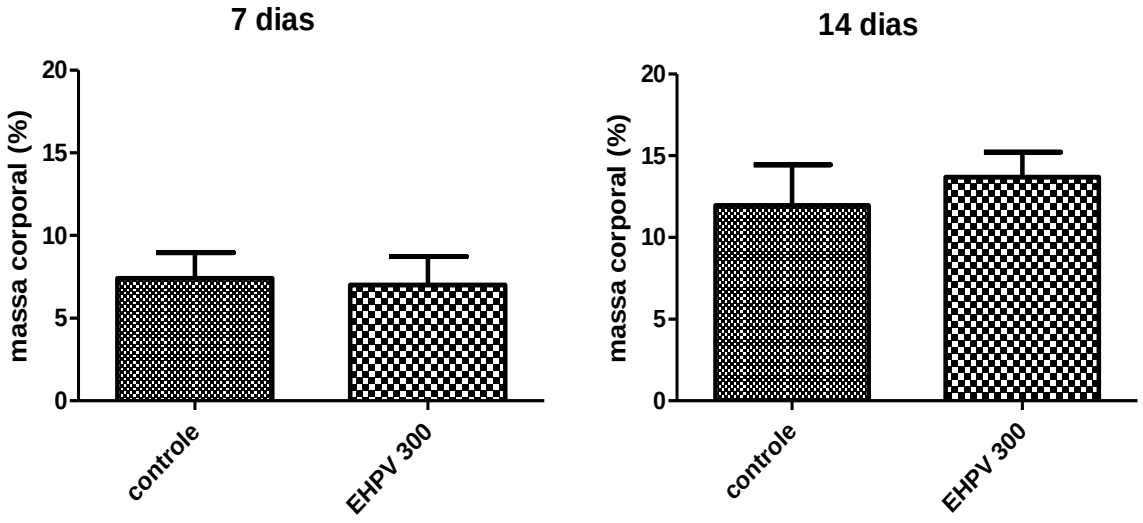


Figura 5: Avaliação da massa corpórea das ratas dos grupos controle e EHPV300 após 7 e 14 dias do início do experimento. Dados expressos em % em relação à massa inicial dos animais, n = 05/grupo (teste *t*-Student, $p > 0,05$).

Na análise macroscópica do encéfalo, fígado, rins, pulmões, coração, estômago, baço, ovários e testículos, não foram encontradas alterações nos grupos estudados.

Segundo Almeida (2006), sonolência, diminuição da ambulação e redução do ritmo da respiração são efeitos depressores do sistema nervoso central, enquanto que a diarreia pode ser um indicativo do efeito do extrato no sistema autonômico. Os tremores compreendem a movimentação involuntária de todo ou parte do corpo. Tais sinais indicam um possível efeito do EHPV no sistema nervoso central.

De acordo com critérios previamente estabelecidos, a ocorrência de ≥ 1 animal com sinais de toxicidade, sem mortes, como observado no grupo EHPV300, permite a classificação de uma substância na categoria GHS 4, que sugere o uso com cautela (“*warning”)* (OECD, 2001; UNECE). Existem poucos relatos sobre a toxicidade da própolis vermelha brasileira. Nunes *et al*. (2009) avaliaram a toxicidade *in vitro* de uma amostra de própolis vermelha da cidade de Goiana-PE sobre *Artemia salina.* O extrato metanólico da própolis em questão apresentou uma DL50 igual a 18,9 µg/mL. Outro estudo avaliou a toxicidade de uma amostra de própolis vermelha sergipana onde camundongos Swiss receberam 1g/kg do extrato por 14 dias. Os resultados mostraram que na dose de 1g/kg não houve morte dos animais e até 7 dias de administração do extrato foi demonstrada ausência de toxicidade, porém com 14 dias foi detectada toxicidade hepática nos animais (RODRIGUES, 2010).

Por outro lado, amostras de própolis de outras variedades não promoveram sinais tóxicos ou morte dos animais em ensaios agudos. Por exemplo, Araújo *et al*. (2011), utilizando extrato hidroalcoólico de própolis proveniente do Maranhão (produzida por abelhas *Scaptotrigonaaff. Postica*) nas dosagens de 1.000, 2.000 e 4.000 mg/kg, não observaram morte dos animais e relataram diminuição dos níveis de ALT e FAL. Mohammadzadeh *et al*. (2007), avaliaram a toxicidade de uma amostra de própolis iraniana em altas doses (4.500 , 9.000 , 13.000 e 20.000 mg/kg) e também não observaram sinais tóxicos ou morte dos animais.

Os resultados da toxicidade aguda do presente estudo sugerem, portanto, uma maior toxicidade da própolis vermelha alagoana. Estas diferenças estão possivelmente relacionadas à composição química que pode variar em função de fatores como sazonalidade e origem botânica (TEIXEIRA *et al*., 2010; MENDONÇA *et al*., 2011).

Em adição, estima-se que o valor de DL50 do EHPV esteja acima de 300 mg/kg. No entanto, para obter uma estimativa de DL50 pela metodologia preconizada pela OECD utilizada neste estudo, seria necessária a avaliação da toxicidade de algumas substâncias que compõem o extrato. Tal avaliação poderá ser o foco de futuras pesquisas para uma melhor compreensão da toxicidade aguda desse produto natural.

5.3 Análise da toxicidade subaguda do EHPV

Na avaliação pré-clínica da toxicidade subaguda do EHPV não houve morte nos grupos avaliados. Porém, a ocorrência de episódios de diarreia foi comum aos grupos controle (20% dos animais) e EHPV10 (30% dos animais), ocorrendo com maior frequência nos grupos EHPV100 (60% dos animais) e EHPV200 (50% dos animais). O estresse causado pela manipulação diária dos animais pode afetar o seu sistema nervoso autônomo e causar diarreia até no grupo controle, porém, como houve uma maior frequência de diarreia nos grupos de doses maiores, tal extrato realmente pode está favorecendo a intensificação desse sintoma.

Outros sinais como respiração ofegante (10%) e diminuição da ambulação (20%) foram parâmetros encontrados no grupo de EHPV100 de modo pontual em animais machos, não permanecendo ao longo do experimento (tabela 1). A maioria dos sinais de toxicidade apresentados no estudo agudo também foi verificada no estudo subagudo, corroborando a sugestão de um possível efeito EHPV sobre o sistema nervoso central (ALMEIDA, 2006).

Tabela 1: Sinais de toxicidade subaguda do EHPV.

Grupo	Dia	Animais	Sinais de toxicidade
Controle	4	M1	Diarreia
	6	M1	
	23	M2	
	26	M2	
EHPV 10 mg/kg	3	M3	Diarreia
	5	M5	
	27	F3	
EHPV100 mg/kg	1	M3	Respiração ofegante
	1	M3	Diminuição da ambulação
	5	M1	
	6	M1	
	2	M3	Diarreia
	4	M1 e M5	
	5	M1	
	6	M5	
	8	F3	
	16	M1	
	18	F2	
	20	F2	
	21	F5	
	22	F5	
	27	F5	
EHPV 200 mg/kg	2	F5 e M3	Diarreia
	3	M1	
	5	F4	
	10	M2	
	25	F4	

Avaliação dos sinais de toxicidade subaguda dos grupos controle, EHPV 10, 100 e 200 mg/kg. M: machos, F: fêmeas.

A figura 6 apresenta o consumo de água e ração dos animais submetidos ao teste de toxicidade subaguda. Foi verificada diferença significativa no consumo de água de machos e fêmeas dos grupos EHPV quando comparados ao controle. As fêmeas do grupo EHPV100 consumiram mais água na terceira semana ($p < 0,001$), já os machos do grupo EHPV 200 consumiram mais água na primeira semana ($p < 0,001$).

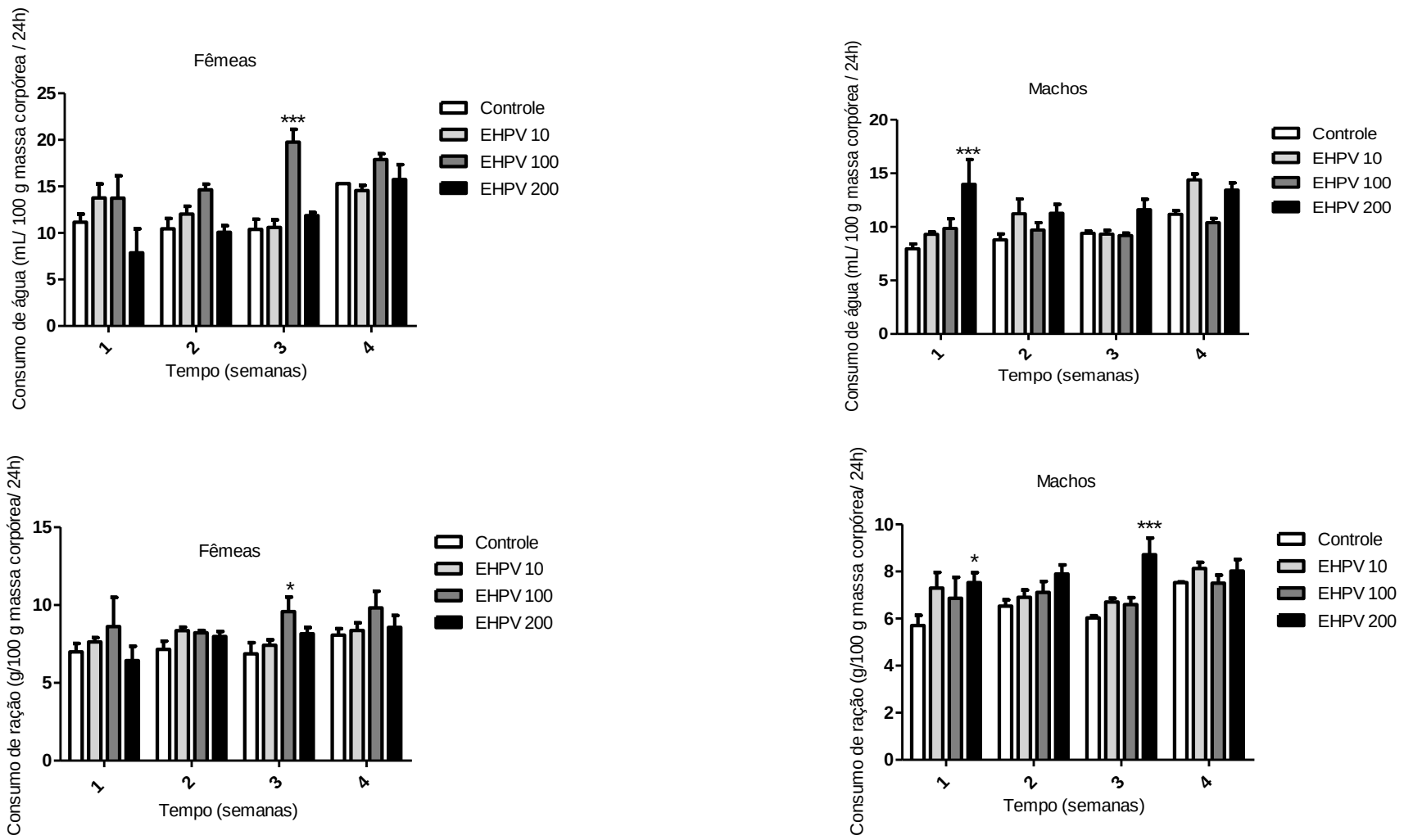


Figura 6: Consumo semanal de água (mL) e ração (g) dos animais, para os grupos controle e EHPV nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg. Diferença significativa em relação ao controle, *p<0,05 e ***p <0,001, ANOVA de duas vias (tratamento e tempo) seguida do pós-teste Tukey, n=5.

Em relação ao consumo de ração, na terceira semana as fêmeas do grupo EHPV100 consumiram mais ração que as fêmeas do grupo controle ($p<0,05$), e os machos do grupo EHPV 200 mg/kg consumiram mais ração na primeira ($p<0,05$) e na terceira semana ($p<0,001$).

Foi observado que após 7 dias do início do experimento, as ratas tratadas com EHPV 100 mg/kg apresentaram aumento de massa corpórea ($p<0,05$). Já na segunda ($p<0,05$), terceira ($p<0,05$) e quarta semana ($p<0,001$) as ratas do grupo EHPV200 ganharam mais massa corpórea quando comparadas ao grupo controle (figura 7A).

Houve um maior ganho de massa corpórea dos machos do grupo EHPV200 em relação ao controle na terceira ($p<0,05$) e quarta semana ($p<0,01$) de administração do extrato (figura 7B).

Observou-se que ocorreram aumentos pontuais do consumo de água e ração por machos e fêmeas. Tal aumento parece não estar relacionado com o aumento de massa corpórea dos animais quando analisados ao longo do tempo. Além disso, as fêmeas apresentam ganho de massa corpórea já na primeira semana de tratamento com o EHPV. Este fato pode ser explicado devido ao papel do estrógeno endógeno na regulação da massa corpórea em fêmeas, que se encontra bem fundamentado na literatura, inclusive quanto às suas interações com os diferentes tipos de receptores existentes. Os receptores de estrógeno alfa (RE-α) mediam os efeitos de estrógenos que levam à diminuição da ingestão alimentar e perda de massa corpórea. Por outro lado, a ligação com receptores de estrógeno beta (RE-β) não influencia esta ingestão alimentar e não interfere na regulação de ganho de massa corpórea (ROESCH, 2006).

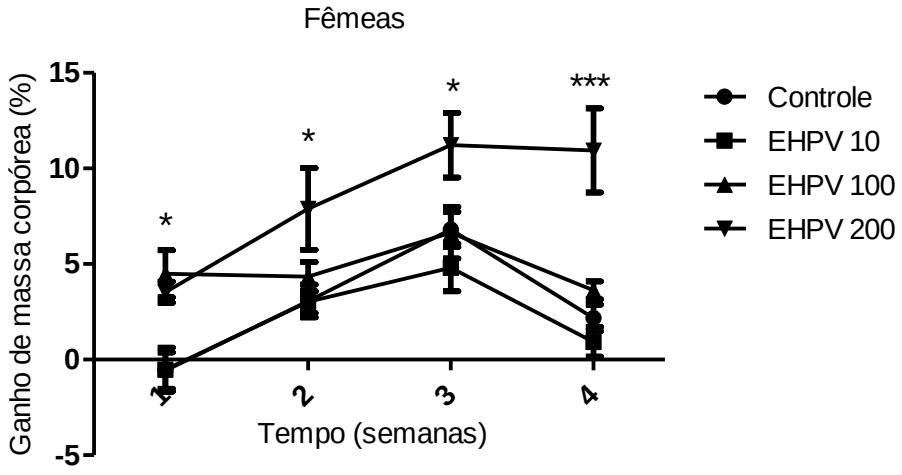
A própolis vermelha é rica em isoflavonas, que são substâncias que apresentam efeito estrogênico por possuírem semelhança estrutural com os hormônios estrogênicos. Tais substâncias se ligam preferencialmente a receptores RE-β (MORITO *et al*., 2001), e portanto o consumo destas isoflavonas não deveria alterar a massa corpórea dos animais. Porém, houve um aumento de massa significativo nas fêmeas tratadas com EHPV200 durante todo o experimento. Estes resultados podem ser explicados pelo fato que a administração de altas doses de isoflavonas pode reduzir os níveis de estradiol endógeno (LU *et al*., 1996). Com isso, a ausência de modulação estrogênica via RE-α pode produzir um efeito de aumento de massa corpórea nos animais, similar ao evento que ocorre na menopausa ou após ooforectomia (ROESCH, 2006).

Corroborando estes achados, foram observadas alterações na regularidade do ciclo estral em 40% das ratas do grupo EHPV10 e em 100% das dos grupos EHPV100 e

EHPV200, enquanto todas as ratas do grupo controle apresentaram ciclo regular durante o período de 28 dias. Adicionalmente, as alterações no ciclo estral foram mais evidentes na primeira e segunda semana de tratamento com EHPV100 (80%) e na terceira e quarta semanas de tratamento com EHPV200 (80%), dados que coincidem com o ganho de massa corpórea em cada grupo.

Em ratas, o ciclo estral é caracterizado por um aumento de estrógeno no segundo dia do diestro. Este estrógeno interage com RE-β e promove um aumento da liberação de hormônio luteinizante (LH) pela hipófise anterior, que induz uma breve resposta do corpo lúteo, seguida da fase de estro (GOLDMAN *et al*., 2007; MURR *et al*., 1973; OECD, 2009; ANDERSSON *et al*., 2013). Dessa forma, os efeitos do EHPV em ratas são indicadores de efeitos no sistema endócrino envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-ovários.

A)



B)

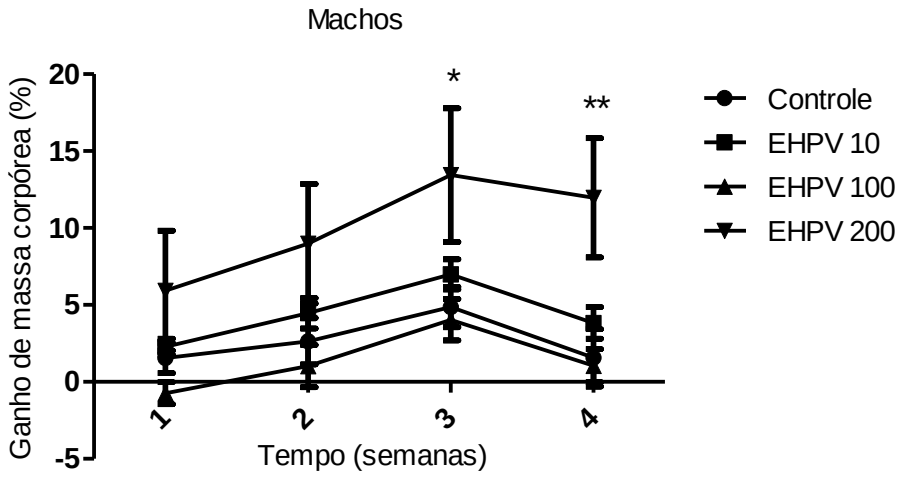


Figura 7: Avaliação da massa corpórea de ratos. Valores expressos em porcentagem em relação ao primeiro dia de tratamento em fêmeas (A) e machos (B), ao longo de semanas. (n = 5/grupo) e as barras indicam o erro padrão da média. EHPV: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. Diferença significativa em relação ao controle *p<0,05, **p<0,01 e ***p <0,001. ANOVA de duas vias (tratamento e tempo) seguida do pós-teste Tukey.

A tabela 2 apresenta o efeito da administração oral subaguda do EHPV na massa relativa dos órgãos dos animais. A avaliação da massa dos órgãos das fêmeas mostrou um aumento significativo do baço do grupo EHPV100 em relação ao controle ($p < 0,001$). Alterações na massa de órgãos linfóides como baço e timo devem ser analisadas junto com achados histopatológicos relevantes, devido à variabilidade do peso desses órgãos (SELLERS *et al*., 2007). Por outro lado, Oršolic´; Bašic´ (2005) relataram a ação da própolis sobre a estimulação da hematopoiese e no crescimento e diferenciação das células do baço, tal ação pode estar relacionada com o aumento do baço na dose de 100 mg/kg.

Em relação à análise realizada com os dados da massa dos órgãos dos machos, resultados mostraram um aumento significativo da massa dos pulmões ($p < 0,01$) no grupo EHPV 100 mg/kg e diminuição da massa do testículo ($p<0,01$) do grupo EHPV200 quando comparados ao grupo controle.

Segundo a Sociedade de Patologia Toxicológica os pesos dos pulmões são valiosos como pontos finais para estudos de inalação, já para estudos que não envolvem esse tipo de administração a avaliação do peso dos pulmões acrescenta pouco valor à avaliação microscópica e deveria ser opcional (SELLERS *et al*., 2007).

De acordo com Bae *et al*. (2012) a daidzeina, formononetina e principalmente a biochanina A são inibidores da 5α-redutase, que é uma enzima que converte testosterona em dihidrotestosterona (andrógeno mais potente). A diminuição desse hormônio é importante no controle de doenças andrógeno-dependentes como hiperplasia benigna da próstata, calvície e acne. Tal inibição hormonal pode ser uma das causas da diminuição da massa testicular encontrada no presente estudo. O uso oral de isoflavonas em ratos machos pode diminuir a secreção de androgénios e glucocorticóides e isso pode atrasar o início da puberdade e causar problemas fisiológicos e de desenvolvimento (CACERES *et al*., 2014).

Tabela 2: Efeito da administração oral subaguda do EHPV na massa relativa dos órgãos de ratos Wistar (massa do órgão / massa corpórea %).

	Fêmeas				Machos			
Órgãos	Controle	EHPV 10	EHPV 100	EHPV 200	Controle	EHPV 10	EHPV 100	EHPV 200
Encéfalo	0,83 ± 0,02	0,82 ± 0,01	0,86 ± 0,02	0,82 ± 0,03	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,03	0,59 ± 0,02	0,53 ± 0,01
Fígado	3,26 ± 0,08	3,51 ± 0,16	3,94 ± 0,30	3,26 ± 0,01	2,74 ± 0,08	2,71 ± 0,06	2,79 ± 0,16	2,83± 0,12
Rins	0,86 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,91 ± 0,04	0,91 ± 0,07	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,02	0,85 ± 0,04	0,79 ± 0,3
Pulmões	0,44 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,49 ± 0,02	0,35 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,50 ± 0,03**	0,41 ± 0,03
Coração	0,39 ± 0,01	0,44 ± 0,2	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,37 ±0,01	0,36 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,02
Estômago	0,92 ± 0,06	0,87 ± 0,08	1,02 ± 0,10	1,26 ± 0,04	0,72 ± 0,08	0,56 ± 0,02	0,74 ± 0,10	0,77 ± 0,05
Baço	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,24 ± 0,01***	0,18 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,13 ± 0,00
Ovário	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	-	-	-	-
Testículo	-	-	-	-	0,44 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,38 ± 0,01**

Os valores são expressos como média ± EPM, ANOVA de uma via seguida do pós-teste Tukey, ** p <0,01, *** p <0,001 estatisticamente significativo em comparação com o grupo do controle. EHPV: extrato hidroalcoólico da própolis vermelha nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg.

A tabela 3 apresenta resultados da avaliação dos parâmetros hematológicos das fêmeas no estudo subagudo do EHPV. Houve uma diminuição significativa do volume corpuscular médio (VCM) do grupo EHPV100 ($p<0,05$) e EHPV200 ($p<0,001$), porém estes valores estão dentro dos parâmetros de normalidade, 49,1 - 62,5 (fL) (MELO *et al*., 2012). Já em relação à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) notou-se um aumento no grupo EHPV200 ($p<0,01$), estes valores também estão dentro dos valores de referência 29,9 - 34,9 (g/dL) (MELO *et al*., 2012).

Nos machos houve uma diminuição da CHCM nos grupos EHPV10 ($p<0,05$) e EHPV100 ($p<0,01$), diminuição da quantidade de eosinófilos ($p<0,05$) e aumento da quantidade de monócitos ($p<0,01$) do grupo EHPV200 (tabela 4). Tais alterações estão dentro dos parâmetros de normalidade, CHCM 30,5 - 35,3 (g/dL), monócitos 1,0 - 6,5 (%) (MELO *et al*., 2012) e eosinófilos 0,3 - 4,0 (%) (LIMA *et al.,* 2014).

Os tratamentos com EHPV 10 e 100 mg/kg aumentaram significativamente os níveis de glóbulos vermelhos ($p<0,05$) e hemoglobina ($p<0,05$) dos machos quando comparados ao controle. Os valores desses parâmetros estão acima de valores de referência encontrados na literatura, hemoglobina 12,8 - 15,9 (g/dL) e glóbulos vermelhos 6,7 - 8,6 ($x10^6$ /uL) (MELO *et al.,* 2012), hemoglobina 10,20 - 17,80 (g/dL) e glóbulos vermelhos 4,72 - 10,25 ($x10^6$/µL) (LIMA *et al.,* 2014). Um estudo demonstrou que a própolis age diretamente sobre a hematopoiese da medula óssea e possui propriedades estimulantes e regenerativas desse processo (ORŠOLIC; BAŠIC´, 2005). Tal estimulação pode ser a possível causa da elevação da hemoglobina e glóbulos vermelhos observadas no presente trabalho e como essa alteração não foi observada na dose de 200 mg/kg, esse efeito pode ser dose/dependente.

Os estudos de Melo *et al*. (2012) e Lima *et al*. (2014) trazem valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos wistar saudáveis do estado e Sergipe. Segundo Dias Junior (2006), para uma interpretação correta do eritrograma, pesquisadores têm procurado estabelecer valores de referência para animais da mesma região.

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros hematológicos das fêmeas submetidas à administração oral do EHPV no estudo subagudo.

Parâmetros hematológicos	Fêmeas			
	Controle	EHPV 10 mg/kg	EHPV 100 mg/kg	EHPV 200 mg/kg
GB ($x10^3$/µL)	3,96 ± 1,17	4,58 ± 0,58	4,37 ± 0,65	4,42 ± 0,36
Linfócitos (%)	69,43 ± 3,93	69,02 ± 2,80	70,18 ± 1,77	65,40 ± 1,00
Monócitos (%)	1,98 ± 0,68	4,64 ± 3,40	0,78 ± 0,35	4,53 ± 0,22
Eosinófilos (%)	0,80 ± 0,20	1,22 ± 0,39	1,10 ± 0,10	0,23 ± 0,03
Neutrófilos (%)	27,40 ± 3,58	29,68 ± 3,47	27,90 ± 2,04	29,43 ± 0,95
PLT ($x10^3$/µL)	1029,00 ± 107,6	981,60 ± 227,90	1052,00 ± 244,90	912,70 ± 34,14
GV ($x10^6$/µL)	8,28 ± 0,70	9,02 ± 0,68	8,45 ± 0,91	7,20 ± 0,31
Hemoglobina (g/dL)	15,53 ± 1,23	16,48 ± 1,16	15,34 ± 1,36	12,90 ± 0,45
Hematócrito (%)	51,78 ± 4,58	55,12 ± 4,43	49,92 ± 5,03	37,90 ± 1,26
VCM (fL)	62,48 ± 1,16	61,04 ± 0,48	58,70 ± 0,86*	52,70 ± 0,67***
HCM (pg)	18,78 ± 0,11	18,32 ± 0,15	18,14 ± 0,30	17,97 ± 0,29
CHCM (g/dL)	30,08 ± 0,57	30,00 ± 0,41	30,92 ± 0,56	34,03 ± 0,19**

Diferença significativa em relação ao grupo controle, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$. A-NOVA de uma via seguida do pós-teste Tukey. GB: glóbulos brancos, PLT: plaquetas, GV: glóbulos vermelhos, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. EHPV: extrato hidroalcoólico da própolis vermelha nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg.

Tabela 4: Avaliação dos parâmetros hematológicos dos machos submetidos à administração oral do EHPV no estudo subagudo.

Parâmetros hematológicos	Machos			
	Controle	EHPV 10 mg/kg	EHPV 100 mg/kg	EHPV 200 mg/kg
GB ($x10^3$/µL)	7,30 ± 0,65	7,79 ± 1,12	6,28 ± 0,40	6,82 ± 1,04
Linfócitos (%)	55,20 ± 1,76	54,58 ± 2,43	62,48 ± 3,49	49,30 ± 1,60
Monócitos (%)	1,18 ± 0,27	0,84 ± 0,28	1,05 ± 0,13	3,30 ± 0,57**
Eosinófilos (%)	2,50 ± 0,31	2,42 ± 0,43	1,70 ± 0,42	0,27 ± 0.09*
Neutrófilos (%)	40,93 ± 1,25	41,80 ± 2,09	34,58 ± 2,55	46,93 ± 2,07
PLT ($x10^3$/µL)	1130,00 ± 48,76	1001,00 ± 65,72	1072,00 ± 114,90	924,70 ± 42,68
GV ($x10^6$/µL)	9,13 ± 0,59	11,96 ± 0,94*	12,19 ± 1,02*	8,78 ± 0,40
Hemoglobina (g/dL)	16,40 ± 1,12	20,20 ± 1,30*	20,80 ± 1,61*	15,10 ± 0,57
Hematócrito (%)	50,70 ± 3,60	65,34 ± 4,62	68,45 ± 5,68	45,20 ± 1,64
VCM (fL)	55,48 ± 0,35	54,74 ± 1,36	56,18 ± 0,46	51,53 ± 0,47
HCM (pg)	17,98 ± 0,05	17,00 ± 0,36	17,10 ± 0,24	17,23 ± 0,12
CHCM (g/dL)	32,35 ± 0,12	31,02 ± 0,42*	30,45 ± 0,35 **	33,43 ± 0,12

Diferença significativa em relação ao grupo controle, * $p<0,05$, ** $p<0,01$. ANOVA de uma via seguida do pós-teste Tukey. GB: glóbulos brancos, PLT: plaquetas, GV: glóbulos vermelhos, VCM: volume corpuscular médio, HCM: hemoglobina corpuscular média, CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. EHPV: extrato hidroalcoólico da própolis vermelha nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg.

Os valores dos parâmetros bioquímicos das fêmeas estão apresentados na tabela 5. Os resultados significativos foram em relação ao grupo controle. As análises demonstraram um aumento da ureia no grupo EHPV10, porém seu valor ainda está dentro do valor de referência (30 - 57 mg/dL) (MELO *et al*., 2012). Os níveis de fosfatase alcalina do grupo EHPV100 também aumentaram, mas permaneceram dentro do valor de referência (51 - 116 U/L) (LIMA *et al*., 2014). No grupo EHPV200 houve um aumento dos valores de sódio e colesterol total, mas tais variações se encontram dentro dos valores de referência 125 - 141 (mmol/L) e 46 - 101 (mg/dL), respectivamente (LIMA *et al* 2014; MELO *et al.,* 2012).

A tabela 6 apresenta a avaliação bioquímica dos machos, foram encontradas alterações apenas do grupo EHPV200 quando comparados ao controle. Houve aumento das médias de proteínas totais, sódio, fosfatase alcalina, creatinina, colesterol total, alanina aminotransferase e albumina, porém esses valores ainda estão dentro da faixa de referência: 4,0 - 6,9 (g/dL), 125 - 143 (mmol/L), 56 - 153 (U/L), 0,24 - 1,20 (mg/dL), 45 - 76 (mg/dL), 38 - 82 (U/L); 2,0 - 3,5 (g/dL), respectivamente (LIMA *et al*., 2014).O valor para triglicerídeos foi o único que com diminuição em relação ao controle, mas o valor de 22,7 ainda está dentro do valor de referência 22 - 100 (mg/dL) (LIMA *et al*., 2014).

Embora os resultados bioquímicos tenham permanecido dentro dos valores de referência, não deve ser descartada a possibilidade de algum grau de toxicidade do EHPV administrado de forma subaguda, especialmente quando consideradas alterações como aumento da massa do pulmão em machos, aumento da massa do baço em fêmeas e diminuição da massa dos testículos em machos.

Alterações em enzimas hepáticas são relevantes para a análise toxicológica. Por exemplo, alterações nas quantidades de fosfatase alcalina e ALT podem ocorrer em resposta a xenobióticos. A ALT é uma enzima citosólica que, quando apresenta níveis aumentados, pode indicar necrose do fígado ou modificações na permeabilidade da membrana dos capilares sanguíneos (COSTA SILVA *et al*., 2008, UPUR *et al*., 2009). No presente estudo houve um aumento de valores de ALT nos machos e esse dado corrobora com um estudo que também encontrou um aumento nas enzimas hepáticas ALT e AST após tratamento agudo com própolis vermelha sergipana (RODRIGUES, 2010). Vale destacar que outros indicadores desta função mostraram alterações em machos, como o aumento das quantidades de proteínas totais e diminuição de triglicerídeos. Estes dados assemelham-se com o de Morsy *et al.* (2013) que observaram o mesmo comportamento desses parâmetros na avaliação bioquímica do soro de ovelhas tratadas com própolis vermelha.

.

Tabela 5: Avaliação dos parâmetros bioquímicos das fêmeas submetidas à administração oral do EHPV no estudo subagudo.

Parâmetros bioquí-micos	Fêmeas			
	Controle	EHPV 10 mg/kg	EHPV 100 mg/kg	EHPV 200 mg/kg
ALT (U/L)	51,8 ± 4,9	42,2±2,5	65,2±5,8	55,0±1,7
AST (U/L)	92,8±9,6	74,8±2,5	97,2±11,9	65,7±3,8
AU (mg/dL)	2,5±0,4	2,3±0,5	2,6±0,8	1,6±0,3
Ureia (mg/dL)	35,0±3,8	56,8±7,4*	34,8±2,5	48,0±1,0
Creatinina (mg/dL)	0,52±0,03	0,53±0,03	0,46±0,03	0,48±0,02
Glicose (mg/dL)	182,2±17,6	127,4±10,1	125±20,1	174,0±8,4
CT (mg/dL)	68,0±3,5	62,8±2,6	75,4±2,1	94,7±1,9***
PT (g/dL)	5,7±0,2	5,4±0,2	5,2±0,3	6,5±0,1
Sódio (mmol/L)	131,8±0,7	131,8±1,2	132,6±1,4	140,7±0,7***
Potássio (mmol/L)	7,8±0,7	6,9±1,0	8,3±0,8	5,6±0,8
Albumina (g/dL)	2,7±0,1	2,6±0,1	2,5±0,1	3,1±0,1
TRI (mg/dL)	36,0±3,4	33,6±2,4	41,2±1,7	33,7±7,4
FAL (U/L)	55,0±4,8	53,8±3,1	94,8±10,1**	71,0±0,0

Diferença significativa em relação ao grupo controle,* ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$). ANOVA de uma via seguida do pós-teste Tukey. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, AU: ácido úrico, CT: colesterol total, PT: proteínas totais, TRI: triglicerídeos, FAL: fosfatase alcalina. EHPV: extrato hidroalcoólico da própolis vermelha nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg.

Tabela 6: Avaliação dos parâmetros bioquímicos dos machos submetidos à administração oral do EHPV no estudo subagudo.

Parâmetros bio-químicos	Machos			
	Controle	EHPV 10 mg/kg	EHPV 100 mg/kg	EHPV 200 mg/kg
ALT (U/L)	47,2±4,1	39,0±2,2	38,8±3,5	61,7±0,3*
AST (U/L)	73,2±7,6	78,4±5,5	65,0±4,0	85,7±2,3
AU (mg/dL)	1,1±0,1	1,4±0,1	2,3±1,0	1,6±0,3
Ureia (mg/dL)	31,8±3,2	28,2±0,6	31,5±1,3	36,7±1,7
Creatinina (mg/dL)	0,39±0,02	0,39±0,01	0,42±0,03	0,50±0,00**
Glicose (mg/dL)	198,4±11,0	148,2±9,2	168,8±22,4	229,7±29,2
CT (mg/dL)	46,0 ± 2,0	50,4 ± 2,9	49,0 ± 3,4	64,3 ± 4,9**
PT (g/dL)	4,5 ± 0,1	4,6 ± 0,3	4,7 ± 0,3	6,1 ± 0,7***
Sódio (mmol/L)	133,0±1,0	132,6±0,6	134,8±0,3	142,3±0,3***
Potássio (mmol/L)	5,7±0,4	7,2±0,4	7,1±0,6	5,3 ± 0,9
Albumina (g/dL)	2,1±0,0	2,1±0,1	2,2±0,1	2,8 ± 0,0**
TRI (mg/dL)	38±4,2	25,8±1,0	28,0±4,1	22,7 ± 3,4*
FAL (U/L)	66,4 ± 7,8	63,0 ± 7,5	70,8 ± 9,6	126,7 ± 19,4**

Diferença significativa em relação ao grupo controle,* ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$), ANOVA de uma via seguida do pós-teste Tukey. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, AU: ácido úrico, CT: colesterol total, PT: proteínas totais, TRI: triglicerídeos, FAL: fosfatase alcalina. EHPV: extrato hidroalcoólico da própolis vermelha nas doses de 10, 100 e 200 mg/kg.

Após a administração diária do EHPV durante 28 dias, oito animais, sendo quatro pertencentes ao grupo EHPV200 e quatro pertencentes ao grupo controle (dois machos e duas fêmeas para cada grupo), foram observados por mais 14 dias para a avaliação de sinais de toxicidade retardada (grupo satélite). Nenhum animal apresentou sinais de toxicidade durante o tempo avaliado.

Não foram encontradas alterações na análise macroscópica dos órgãos dos animais. Na avaliação histológica do fígado, rim e baço (figura 8) dos grupos controle e EHPV200 não foram encontradas alterações histopatológicas nos tecidos.

Embora a administração do EHPV em roedores não tenha causado alterações macroscópicas e histopatológicas do fígado, rim e baço, é importante considerar as alterações na massa corpórea, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos e ciclo estral como um alerta no consumo desse produto natural. Além disso, pode-se considerar uma estimativa do NOEL abaixo da dose de 10 mg/kg, uma vez que nessa dose já foi possível observar algumas alterações.

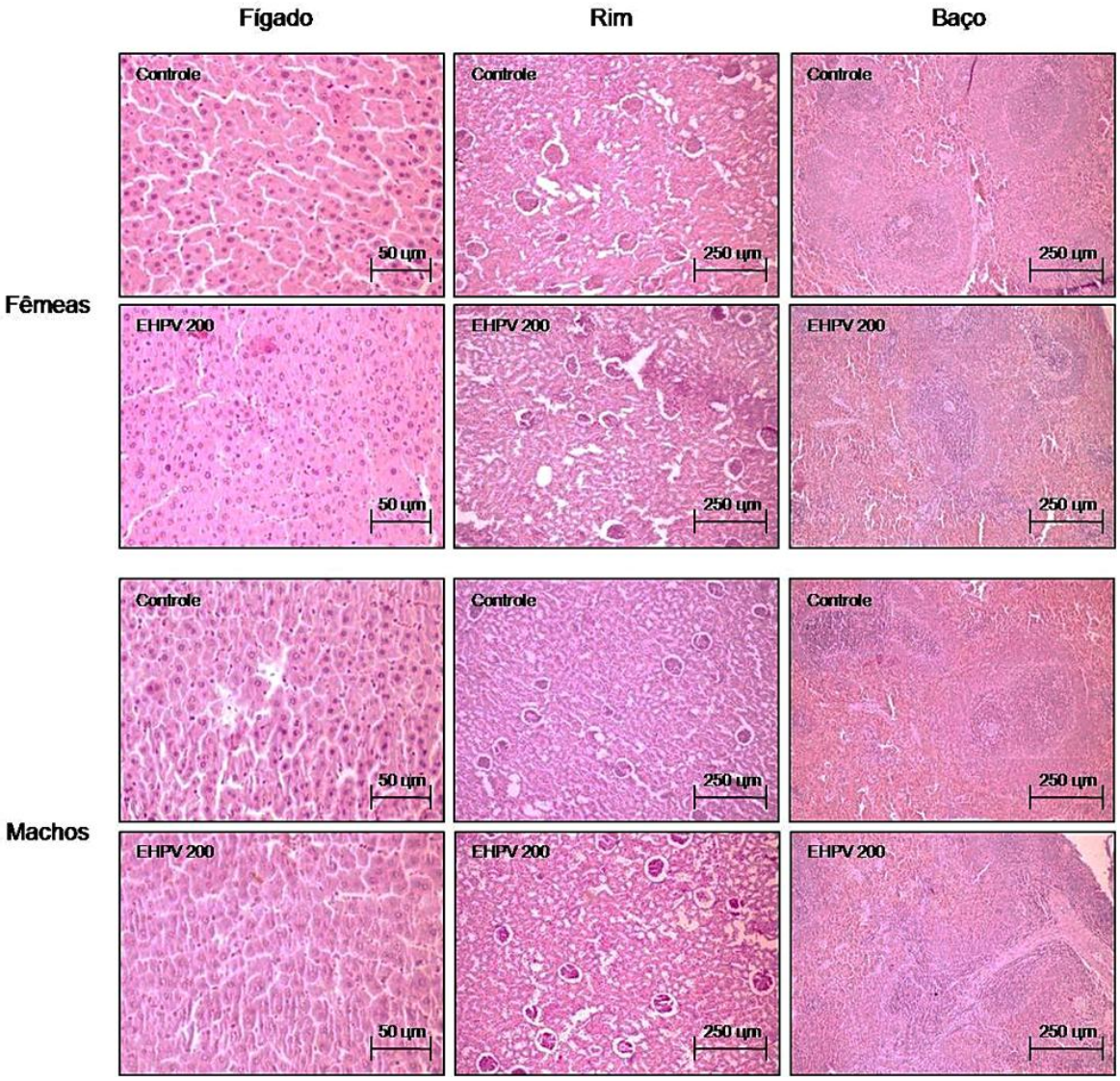


Figura 8: Avaliação histopatológica do fígado, rim e baço de fêmeas e machos do grupo controle e EHPV 200 mg/kg do estudo de toxicidade subaguda do EHPV. Fígado (HE 400), rim e baço (HE 100) sem alterações histopatológicas.

Capítulo IV – CONCLUSÕES

6. CONCLUSÃO

O EHPV utilizado no presente estudo apresentou as isoflavonas daidzeína, biochanina A e formononetina em sua composição, características químicas coerentes com os achados anteriores para a própolis vermelha de Alagoas.

Os resultados da toxicidade aguda do EHPV demonstraram que a DL50 está acima de 300 mg/kg, porém essa dose foi capaz de provocar alguns sinais clínicos de toxicidade aguda sem mortalidade dos animais.

A administração subaguda do EHPV nas doses de 100 e 200 mg/kg geraram alterações na massa corpórea, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e hematológicos e ciclo estral. O estudo subagudo também indicou uma estimativa do NOEL abaixo da dose de 10 mg/kg.

Portanto, tanto a avaliação da toxicidade aguda como subaguda sugerem que este tipo de própolis deve ser consumido com precaução.

Capítulo V – REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABREU, A. P. L. *Estudo comparativo da atividade antiinflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde, Fortaleza – Brasil* [Dissertação]. Fortaleza: Universidade federal do Ceará; 2008.

ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J. A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M.A.G.; CARDOSO, J. C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red própolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology* 2009; 27(4): 1105-1110.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 113(2): 78-83.

ALMEIDA, E. B.; CARDOSO, J.; LIMA, A. K.; OLIVEIRA, N. L.; PONTES-FILHO , N. T.; LIMA, S. O.; SOUZA, I. C. L.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing C. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 147: 419-425.

ALMEIDA, R. N. D. Psicofarmacologia - Fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2006.

ALMUTAIRI, S.; EAPEN, B.; CHUNDI, S. M.; AKHALIL, A.; SIHERI, W.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; WATSON, D. G.; EDRADA-EBEL, R. New anti-trypanosomal active prenylated compounds from African própolis. *Phytochemistry Letters* 2014; 10: 35-39.

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. E.; CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 1992; 23(3): 231-240.

ANDERSSON, H.; REHM, S.; STANISLAUS, D.; WOOD, C. E. Scientific and Regulatory Policy Committee (SRPC) Paper: Assessment of Circulating Hormones in Nonclinical Toxicity Studies III. Female Reproductive Hormones. *Toxicologic Pathology* 2013; 41: 921-934.

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária 2010 - Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de Medicamentos**. Brasília, 2010. 37p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [online] 2005. [acessado em 26 Dez 2014]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm.

ANVISA, MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2004. **Resolução n. 90, de 16 de março de 2004**.

ARAÚJO, M. J.; MATTAR, N. S.; REIS, A. S.; SERRA, I. C.; FIALHO, E. M.; ASSUNÇÃO, A. K.; DUTRA, R. P.; NOGUEIRA, A. M.; LIBÉRIO, S. A.; GUERRA, R. N.; LOPES, A. S.; RIBEIRO, M. N.; NASCIMENTO, F. R. Pharmacognostic and acute toxicological evaluation of *Scaptotrigona aff. Postica* propolis extract in pre-clinical assays. *Nat Prod Res* 2011; 25(11): 1037-46.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; 16:181-189.

BAE, M.; WOO, M.; KUSUMA, I. W.; ARUNG, E.T.; YANG, C. H.; KIM, Y. Inhibitory Effects of Isoflavonoids on Rat Prostate Testosterone 5a-Reductase. *J Acupunct Meridian Stud* 2012; 5(6): 319-322.

BAKOMA, B; BERKÉ, B.; EKLU-GADEGBEKU, K; AGBONON, A.; AKLIKOKOU, K.; GBEASSOR, M.; CREPPY, E. E.; MOORE, N. Acute and subchronic (28 days) oral toxicity evaluation of hydroethanolic extract of Bridelia ferruginea Benth rootbark in male rodent animals. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 52: 176-179.

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

BATISTA, L. L. V.; CAMPESATTO, E. A.; ASSIS, M. L. B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir* 2012; 39(6): 515-520.

BETTI, A. H.; STEIN, A. C.; DALLEGRAVE, E.; WOUTERS, A. T. B.; WATANABE, T. T. N.; DRIEMEIER, D.; BUFFON, A.; RATES, S. M. K. Acute and repeated-doses (28 days) toxicity study of Hypericum polyanthemum Klotzsch ex Reichardt (Guttiferare) in mice. Food *and Chemical Toxicology* 2012; 50(7): 2349-2355.

BISPO JUNIOR, W.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D. W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Ciências Biológicas e da Saúde* 2012; 33(1): 03-10.

BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L. P.; SAITO, M. E.; KUIBIDA, K. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006; 58(4): 675-677.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Seção 1, p. 18.

BRITO, A. S. Manual de Ensaios Toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da Unicamp; 1994.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; IKEGAKI, M. SILVA, G. V. J.; NAPIMOGA, M. H.; ROSALEN, P. L. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. *J. Agric. Food Chem* 2013; *61*(19): 4546-4550.

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* 1998; 36: 347-363.

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. *Química Nova 2009;* 32(6): 1523-1527.

CACERES, S.; SILVAN, G.; FERNANDEZ, L., M.; ILLERA, M.; MILLAN, P.; MONSALVE, B.; PENA, L.; ILLERA, J. The Effects of Isoflavones on Androgens and Glucocorticoids During Puberty on Male Wistar Rats. *Reprod Dom Anim* 2014; 49: 611-617.

CAMPO FERNANDEZ, M.; CUESTA-RUBIO, O.; ROSADO PEREZ, A.; MONTES DE OCA PORTO, R.; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. GC-MS Determination of Isoflavonoids in Seven Red Cuban Propolis Samples. *J. Agric. Food Chem* 2008; 56: 9927-9932.

CATEF - CÂMARA TÉCNICA DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS. [online]. 2005 [acessado em 24 de setembro de 2013]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2004; 40(3): 289-299.

CHIRANTHANUT, N.; TEEKACHUNHATEAN, S.; PANTHONG, A.; KHONSUNG, P.; KANJANAPOTHI, D.; LERTPRASERTSUK, N. Toxicity evaluation of standardized extract of *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 149 (1): 228-234.

COSTA-SILVA, J. H.;LIMA, C. R.; SILVA, E. J.; ARAÚJO, A. V.; FRAGA, M. C.; RIBEIRO E RIBEIRO, A.; ARRUDA, A. C.; LAFAYETTE, S. S.; WANDERLEY, A. G. Acute and subacute toxicity of the Carapa guianensis Aublet (Meliaceae) seed oil. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 28;116(3): 495-500.

CUESTA-RUBIO, O; PICCINELLI, A. L.; FERNANDEZ, M. C.; HERNÁNDEZ, I. M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the Brown, Red, and Yellow Cuban Varieties of Propolis. *J. Agric. Food Chem* 2007; 55: 7502-7509.

CUESTA-RUBIO, O; FRONTANA-URIBE, B.A; RAMI´REZ-APAN, T; CÁRDENAS, J. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Z. Naturforsc* 2002; 57:372-378.

DALANHOL, M.; BARROS, M.; MAZUCHELLI, J.; SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y.; LARGURA, A. Efeitos quantitativos da estocagem de sangue periférico nas determinações do hemograma automatizado. *Rev Bras Hemat Hemoter* 2010; 32(1): 16-22.

DALEPRANE, J. B.; FREITAS, V. S.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L. A.; DÖRR, F. A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L. A.; ONG, T. P.; ABDALLA, D. S. P. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from própolis. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2012; 23(6): 557-566.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2007; 5(4): 435-441.

DIAS JUNIOR R. F.; BRACARENSE, A. P. F.R. L.; MARÇAL, W. S.; ROCHA, M. A.; DIAS, R. C. F. Valores de referência e influência da idade no eritrograma de fêmeas bovinas da raça Aquitânica. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006; 58(3): 311-315.

FRANCHI, G. C. JR.; 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. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 1-6.

FREITAS, J. A.; VANAT, N.; PINHEIRO, J. W.; BALARIN, M. R. S.; SFORCIN, J. M.; VENANCIO, E. J. The effects of propolis on antibody production by laying hens. *Poultry Science* 2011; 90:1227-1233.

FROZZA, C. O. S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O.; SALVADO, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 52:137-142.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80: 84-97.

GRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1830: 3670-3695.

GROTTO, H. Z. W. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009; 31(3): 178-182.

KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, S. K.; DAROKAR, M. P.; GARG, A.; KHANUJA, S. P. Cytotoxic activities of xanthochymol and isoxanthochymol substantiated by LC-MS/MS. *Planta Med* 2007; 73(14): 1452-6.

KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; 2013: 1-11.

LAGARTO, A.; BUENO, V.; GUERRA, I.; VALDÉS, O.; VEGA, Y.; TORRES, L. Acute and subchronic oral toxicities of Calendula officinalis extract in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2011; 63 (4): 387-391.

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

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S.; SERAFINI, M. R.; Albuquerque-Júnior, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus novergicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 2014; 10: 034601.

LIO, A.; OHGUCHI, K.; INOUE, H.; MARUYAMA, H.; ARAKI, Y.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR_ activation. *Phytomedicine* 2010; 17: 974-979.

LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry* 2014; 146: 174-180.

LOTTI, C., FERNANDEZ, M.C., PICCINELLI, A.L., CUESTA-RUBIO, O. HERNANDEZ, I.M. RASTRELLI, L. Chemical constituints of red Mexican própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 2209-2213.

LU, L. W.; ANDERSON, K. E.; GRADY, J. J.; NAGAMANI, M. Effects of Soya Consumption for One Month on Steroid Hormones in Premenopausal Women: Implications for Breast Cancer Risk Reduction. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1996; 5: 63-70.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008; 18(3): 447-454.

MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C.; ARAUJO, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. *Scientia Plena* 2011; 7(4): 046201.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol 2002*; *62* (4A): 609-614.

MAYA, G. C. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina & Laboratorio* 2007; 13: 511-550.

MAYWORM, M. A. S.; LIMA, C. A.; TOMBA, A. C. B.; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, M. L F.; SALATINO, A. Does Propolis Contain Tannins?. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014; 4.

MELO, M. G. D. *Caracterização Físico-química, Avaliação dos efeitos antinoceptivos, redox ativo e da toxicidade da antranorina extraída da Cladina kalbii Ahti*. [Dissertação de Mestra-

do]. Sergipe: Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Pós-graduação em Ciências da Saúde; 2009.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*rattus novergicus* linhagem wistar) provenientes do biotério central da universidade federal de sergipe. *Scientia Plena* 2012; 8.

MENDONÇA, L. S. *Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha* [Dissertação]. Aracaju: UniversidadeTiradentes; 2011.

MINORS, D. S. Physiology of red and white blood cells 2004; 5(5): 174-178.

MISHRA, B.B; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 4769-4807.

MOHAMMADZADEH, S.; SHARIATPANAHI, M.; HAMEDI, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N.; OSTAD, S. N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry* 2007; 103: 1097-1103.

MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O, FERNANDEZ, M. C.; HERNANDEZ, I. M.; FRAGA, J.; PÉREZ, K.; KERSTENS, M.; MAES, L.; COS, P. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(8): 978-984.

MORITO, K.; HIROSE, T.; KINJO, J.; HIRAKAWA, T.; OKAWA, M.; NOHARA, T.; OGAWA, S.; INOUE, S.; MURAMATSU, M.; MASAMUNE, Y. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β. Biol. *Pharm Bull* 2001; 24(4): 351-356.

MORSY, A. S.; ABDALLA, A. L.; SOLTAN, Y. A.; SALLAM, S. M. A.; EL-AZRAK, K. E. M.; LOUVANDINI, H.; ALENCAR, S. M. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. *Trop Anim Health Prod* 2013; 45: 1609-1618.

MOURA, N. S.; VASCONCELOS, A. C. M.; BERNABÉ, B. M.; TEIXEIRA, L. J. Q.; SARAIVA, S. H. Ensaios toxicológicos: um estudo sobre a utilização de testes *in vivo* e *in vitro*. *Enciclopédia Biosfera* 2012; 8(15): 1945-1959.

MURR, S. M.; GESCHWIND, I. I.; BRADFORD, G. E. Plasma LH and FSH during different oestrous cycle conditions in mice. *J Reprod Fertil* 1973; 32: 221-30.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; RUFINO, D. A; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM-NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista. Brasileira de Farmacognosia* 2009; 19(2B): 524-529.

OECD - Organisation of Economic Co-operation and Development , 2001. The OECD Guideline for Testing of Chemicals: 420 Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. OECD, Paris, France.

OECD - Organisation of Economic Co-operation and Development, 2008. The OECD Guideline for Testing of Chemicals: 407 Repeated Dose Oral Toxicity-Rodent: 28-Day or 14-Day Study. OECD, Paris, France.

OECD - Organisation of Economic Co-operation and Development, 2009. Guidance document for histologic evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents. OECD, Paris, France.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; REGITANO-DARCE, M. A. B. ; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M. ; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology* 2011; 77: 208-213.

OLIVEIRA, M. E.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E. D. Apicultores do Estado de Sergipe. *Scientia Plena* 2010; 6: 1.

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; PINO, F. A. B.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. *Journal of Ethnopharmacology* 2012; 140: 428-437.

ORŠOLIC, N.; BAŠIC´, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2005; 59: 561-570.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural* 2002; 32 (6): 997-1003.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A.; Propolis: 100 anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. *Química Nova* 2002; 25 (2): 321-326.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59 (12): 484-6491.

PINHEIRO, K. S.; RIBEIRO, D. R.; ALVES, A. V. F.; PEREIRA FILHO, R. N.; OLIVEIRA, C. R.; LIMA, S. O. ; REIS, F. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2014; 29:11-117.

PORTO, L. C.; SILVA, J.; FERRAZ, A. B. F.; CORRÊA, D. S.; SANTOS, M. S.; PORTO, C. D. L.; PICADA, J. N. Evaluation of acute and subacute toxicity and mutagenic activity of the aqueous extract of pecan shells [Caryaillinoinensis (Wangenh.) K. Koch]. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 59: 579-585.

RAMAIAH SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters.*Food Chem Toxicol* 2007; 45: 1551-1557.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric* 2011; 91: 2363-2370.

RODRIGUES, N. C. *Estudo toxicológico pré-clínico agudo do extrato padronizado de própolis vermelha do Brasil* [Dissertação]. São Paulo: Universidade Bandeirante de São Paulo; 2010.

ROESCH, D. M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiology & Behavior* 2006; 87: 39-44.

SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. *Current Opinion in Chemical* Biology 2011; 15: 497-504.

SELL, S. L.; THOMAS, M. L.; CUNNINGHAM, K. A. Influence of estrous cycle and estradiol on behavioral sensitization to cocaine in female rats. *Drug Alcohol Depend* 2002; 67(3): 281-290.

SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. *Toxicologic Pathology* 2007; 35: 751-755.

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

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2008; 5: 313-316.

SIQUEIRA, A.B.S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R. S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; QUEIROZ, L. A.; PORTO, A. L. F. Trichophyton species susceptibility to green and red própolis from Brazil. *Applied Microbiology* 2008; 48: 90-96.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43(5): 329-337.

SONG, Y. S.; JIN, C. B.; JUNG, K. J.; PARK, E. H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 82 (2-3): 89-95.

SOUZA, I. C. L.; NASCIMENTO, M. F.; NETA, R. G. S.; SANTOS, J. C.; COSTA, L. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. *Glob. J. Med. Med. Sci*. 2013; 1: 044-054.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2010; 7: 307-315.

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; 2013: 1-13.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *e-CAM* 2006; 3: 249- 254.

UNECE - UNITED NATIONS ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)* [online]. 2011 [acessado em 08 set. 2013]. Disponível em: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf.

UPUR, H.; AMAT, N.; BLAZEKOVIC, B.; TALIP, A. Protective effect of Cichorium glandulosum root extract on carbon tetrachloride-induced and galactosamine-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 2022-2030.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50“. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2006; 3(2): 93-98.

WALJI, R; WIKTOROWICZ, M. Governance of natural health products regulation: An iterative process. *Heatlhy policy* 2013; 111: 86-94.

WENDLAND, A. C.; SCHULZ, D. G.; SILVA, J. C. B.; TESSARO, L.; NAKATANI, M. Efeitos da canela (*Cinnamomum verum*) no ciclo estral de ratas (*listar*), V EPCC, 2007, MARINGÁ-PR. **Anais**. Paraná, 2007.

YONAR, S. M.; URAL, M. S.; SILICI, S.; YONAR, M. E. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of Cyprinus carpio carpio: protective role of propolis. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2014; 102: 202-9.

ZHANG, A; SUN, H; WANG, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal* Chemistry 2013; 63: 570-577.

ANEXOS

Anexo A: Sinais de toxicidade

Alterações respiratórias	**Alterações cardiovasculares**
Bloqueio nas narinas	Bradicardia
Dispneia	Taquicardia
Apneia	Arritmia
Ofegante	Vasoconstrição ou dilatação
Cianose	**Alterações do tônus muscular**
Alterações atividades motoras	Hipotonia
Aumento da ambulação	Hipertonia
Diminuição da ambulação	**Alterações gastrointestinais**
Sonolência	Fezes duras, secas e escassas
Perda do reflexo de endireitamento	Diarreia
Perda da resposta à dor	Vômito
Catalepsia	**Alterações renais**
Ataxia	Micção involuntária
Prostração	Urina vermelha
Tremores	**Alterações da pele**
Posição lateral	Edema
Alterações dos reflexos	Avermelhamento da pele
Não fechamento das pálpebras após toque da córnea	**Ocorrências diversas**
Incapacidade de retrair as patas traseiras quando puxadas	Convulsões
Não constrição da pupila na presença de luz	Salivação
Ausência de resposta a um estímulo externo (barulho)	Piloereção
Alterações oculares	Analgesia
Lacrimejamento	Fezes claras
Constrição ou dilatação da pupila independente da presença ou ausência da luz	Queda de pelos
Retração anormal do olho	Vocalizações
Queda das pálpebras	Secreções

Córnea opaca	Excreções
	Alterações a manipulação
	Estereotipias
	Mortes

UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

DECISÃO DA CEUA-UNIT

O projeto, **"Avaliação da toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha"**, processo nº **010913**, foi submetido à avaliação na CEUA-UNIT, pela pesquisadora **Margarete zanardo Gomes**, onde recebeu o parecer de **Aprovado**, dos membros dessa comissão, na reunião realizada no dia 26 de setembro de 2013.

Coordenador (a) da CEUA-UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
Profª. Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

UNIVERSIDADE TIRADENTES
AV. MURILO DANTAS Nº 0 B.FAROLÂNDIA
CEP: 49.032-490 | ARACAJU - SE - BRASIL

TELEFONE: (79)3218 2206
FAX: (79) 3218 21 00

1

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Os itens de identificação estão adequados

Introdução	Adequada

Comentários sobre a Introdução

Organizar melhor os objetivos específicos

Objetivos	Comentário

Comentários sobre os Objetivos

Os objetivos estão adequados

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total 75 Local unit
Cálculo do tamanho da amostra	Não informado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção eqüitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Ausentes
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Não se aplica
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os Itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	mês 11/13
Data de término prevista	mês 02/15
Orçamento	Ausente
Fonte de financiamento externa	Não Informado

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

A proposta tem mértico científico, relevância para a pesquisa e apresenta-se dentro dos critérios éticos em experimentação animal, necessitando distrinchar melhor os objetivos específicos. Portanto, recomendo a aprovação da mesma.

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora

Página 2-2

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Avaliação da toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha

Pesquisador Responsável : Margarete zanardo Gomes

Data da Versão 10/09/2013 | **Cadastro 010913** | **Data do Parecer 26/09/2013**

Grupo e Área Temática **III - Projeto fora das áreas temáticas especiais**

Objetivos do Projeto
-Geral
Avaliar os efeitos toxicológicos do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha.
Específicos
• Avaliar a toxicidade aguda e subaguda da própolis vermelha através da morbidade e/ou mortalidade dos animais, sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais), variações no peso corporal, consumo de água e ração, exames bioquímicos, exames hematológicos, latência, reversibilidade da toxicidade e avaliação histopatológica dos órgãos.
• Padronizar a dose do extrato a ser utilizada.

Sumário do Projeto
A Própolis é uma substância resinosa e complexa obtida pelas abelhas através da coleta de resinas da flora da região (pasto apícola) e alteradas pela ação das enzimas contidas em sua saliva. Esta substância é amplamente comercializada como alimento e tem sido alvo de pesquisas por apresentar propriedades biológicas antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anticariogênica, dentre outras. A própolis vermelha, recentemente classificada e encontrada no nordeste do Brasil, apresenta alto teor de compostos bioativos e atividades biológicas significativamente maiores do que as encontradas em outros tipos de própolis, mas poucos estudos se referem a sua toxicidade e ainda não existe um estudo completo de toxicidade oral do produto natural em questão. Desta forma, esta pesquisa avaliará a toxicidade da própolis vermelha, que é um produto natural local que tem um forte potencial de utilização pela indústria farmacêutica. A metodologia do estudo será realizada seguindo os protocolos da Organisation of Economic Co-operation and Development (OECD), indicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2010). A toxicidade aguda será avaliada seguindo o protocolo Guideline for Testing of Chemicals, acute oral toxicity 420 da OECD. Em jejum cinco ratas fêmeas receberão em dose única 300 mg/Kg do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha, elas serão observadas durante 14 dias e de acordo com os sinais de toxicidade e/ou morte do animal outras doses serão testadas. A toxicidade subaguda será avaliada segundo o protocolo Guideline for Testing of Chemicals, repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents 407 da OECD. Em jejum um grupo controle e três grupos de testes, cada grupo contendo cinco ratos machos e cinco ratas fêmeas, receberão extrato hidroalcoólico da própolis vermelha nas doses de 0, 10, 100 e 500 mg/kg durante 28 dias. Serão observados sinais clínicos (incluindo parâmetros comportamentais), morbidade, mortalidade, duração e reversibilidade da toxicidade uma vez por dia Todos os animais serão pesados e avaliados quanto ao consumo de água e alimento, e as ratas fêmeas serão avaliadas quanto ao seu ciclo estral diariamente. Após 28 dias de tratamento os animais serão anestesiados com ketamina e xilaziana e serão coletados 1,5 mL de sangue, e depois de 48 horas, mais 1,5 mL de sangue por punção cardíaca para a realização de exames bioquímicos e hematológicos, após as coletas de sangue será procedida a eutanásia. Será realizada autópsia em cada animal e retirada dos órgãos de interesse (encéfalo, fígado, rins, pulmões, coração, esôfago, estômago, intestino delgado e cólon, pâncreas, tireóide, suprarrenal, baço, testículos e epididimo, útero e ovários). Serão realizados exames macroscópicos dos órgãos dos animais e avaliação histológica por microscopia, para avaliação de possíveis alterações histopatológicas existentes. As análises estatísticas serão realizadas utilizando o programa SPSS versão 19.0. As diferenças entre os dados obtidos para as diferentes doses serão avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos. Os dados serão apresentados como média ± desvio padrão.

Página 1-2

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT
Prof. Dra. Maria Júlia Nardelli
Comitê de Ética no Uso Animal
Coordenadora