



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

Avaliação do efeito citotóxico/antitumoral de extratos aquoso e alcóolico de própolis

Evaluation of the cytotoxic/antitumor effect of aqueous and alcoholic extracts of propolis

Ingrithy Vendruscolo*, Elisângela Dusman†, Patricia Aline Bressiani‡, Guilherme Berton§, Irede

Angela Lucini Dalmolin

RESUMO

O câncer tem gerado uma grande preocupação na medicina, com isso a pesquisa pelo anticâncer tem ganhado muita importância em busca de novos medicamentos e métodos eficazes para o combate ao câncer. Os alimentos funcionais têm apresentado resultados relevantes por possuírem compostos e substâncias capazes de inibir a progressão da doença. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica/antitumoral de extratos da própolis, pelo teste do MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) frente às células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC), a fim de identificar atividade antitumoral e auxiliar na busca eficaz do tratamento do câncer. As células HTC foram expostas a diferentes concentrações (1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 80 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos comerciais alcoólico e aquoso, pelos tempos de 24, 48 e 72 horas. Os resultados mostraram que os extratos da própolis apresentam efeito citotóxico, resultando em viabilidades celulares menores que 71% (24 horas), 63% (48 horas) e 33% (72 horas) para o extrato etanólico e, 57% (24 horas), 7% (48 horas) e 30% (72 horas) para o extrato aquoso, tornando-as favoráveis para a área farmacêutica.

Palavras-chave: MTT, Citotoxicidade, HTC, Anticâncer.

ABSTRACT

Cancer has generated a great concern in medicine, with this the anticancer research has gained great importance in the search for new drugs and effective methods to fight cancer. Functional foods have shown relevant results for having compounds and substances capable of inhibiting the progression of the disease. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxic/antitumor activity of propolis extracts using the MTT test ((3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2-5-diphenyl-2H bromine tetrazolate) against liver tumor cells of *Rattus norvegicus* (HTC), in order to identify antitumor activity and help in the search for effective cancer treatment. HTC cells were exposed to different concentrations (1, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 80 and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of commercial alcoholic and aqueous extracts for periods of 24, 48 and 72 hours. The results showed that propolis extracts present a cytotoxic effect, resulting in cell viability less than 71% (24 hours), 63% (48 hours) and 33% (72 hours) for the ethanolic extract and 57% (24 hours), 7% (48 hours) and 30% (72 hours) for the aqueous extract, making them favorable for the pharmaceutical area.

Keywords: MTT, Cytotoxicity, HTC, Anticancer.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são aqueles que ao serem consumidos nas dietas possuem funções nutricionais que produzem alguns efeitos metabólicos e apresentam componentes fisiologicamente ativos no organismo, capazes de promover a saúde (MACIEL et al., 2018). Há indícios que a alimentação é o segundo fator de influência na prevenção do câncer. Através de medidas dietéticas factíveis, 30% a 40% dos casos de câncer no mundo poderiam ser prevenidos (PETERMANN et al., 2011).

* Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, Brasil; ingrithy@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão; edusman@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; patriciaab142536@gmail.com

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; guilhermehenriqueberton@gmail.com

© Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, Paraná, Brasil; irededalmolin@utfpr.edu.br



A própolis é um dos produtos naturais utilizados a séculos pela humanidade, existem relatos de sua utilização pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (PEREIRA et al., 2015). É um produto aderente coletado pelas abelhas, sua composição bruta é dividida em 50% de resina de vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos (SILVA-CARVALHO et al., 2015; SOUZA et al., 2016). Várias substâncias químicas têm sido isoladas da própolis, sendo os flavonoides e os fenóis considerados os principais compostos biologicamente ativos (PRADO et al., 2013). Diversos estudos têm confirmado a atividade antimicrobiana (SAWICKA et al., 2012; PRADO et al., 2013), anti-inflamatória (SAWICKA et al., 2012) e antioxidante da própolis (PRADO et al., 2013).

O extrato da própolis tem demonstrado efeitos antitumorais (WATANABE et al., 2011). A ação antiproliferativa da própolis na contenção da progressão do tumor tem sido apresentada na literatura (SAWICKA et al., 2012). Foram estudados os mecanismos de ação antiproliferativa da própolis (PATEL, 2015), para o câncer de cabeça e pescoço (HEHLGANS et al., 2011), mama (WU et al. 2011), fígado (CHEN et al. 2012), pâncreas (LI, 2011), rim (VALENTE et al., 2011), bexiga (DORNELAS et al., 2012), próstata (ENDO et al., 2012), cólon (VALENCA et al, 2013) e pulmão humano (ILHAN-AYISIGI et al., 2020).

Os testes de quimio-sensibilidade baseiam-se na avaliação do efeito de agentes quimioterápicos sobre tumores (MOSMANN, 1983). Os *in vitro* são realizados pela avaliação de cultura de células em contato com agentes quimioterápicos (WEISENTHA et al., 1985). O teste do MTT (3-(4,5 dimetiliazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) é um dos mais utilizados na prática atualmente (MOSMANN, 1983). Ele consiste na avaliação colorimétrica da atividade de células tumorais. Nesse teste ocorre a redução do sal tetrazolato pela enzima hidrogenase succínica presente na mitocôndria das células tumorais, onde se baseia numa coloração violácea avaliada por espectrofotometria (SAIKAWA, et al., 1994).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade citotóxica/antitumoral de extratos alcoólico e aquoso de própolis (comerciais), pelo teste do MTT, sobre as células tumorais hepáticas de *Rattus norvegicus* (HTC).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Solução tratamento

Foram utilizados dois extratos comerciais de própolis, adquiridos em loja de produtos naturais da cidade de Francisco Beltrão-Paraná. Um extrato etanólico de própolis (apis flora gotas), seus ingredientes são: própolis e álcool neutro. E, um extrato aquoso de própolis (propomax gotas), seus ingredientes são: água purificada e extrato de própolis sem álcool. Estes foram testados nas concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de meio de cultura suplementado com soro bovino fetal.

Atividade citotóxica/antitumoral

As células HTC foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm^2 contendo 10 mL de meio de cultura DMEM (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), em estufa do tipo BOD a 37°C.

Para a realização da atividade antitumoral foi realizado o teste do MTT (MOSMANN, 1983), com modificações. Neste teste foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, sendo semeadas $2,0 \times 10^4$ células HTC com meio de cultura, com exceção dos poços de controle sem células (branco) e armazenadas da estufa por 24 horas para a estabilização delas. Após o tempo necessário, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 μL dos tratamentos: meio de cultura (controle negativo), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS – 500 μM) (controle positivo) e tratamentos com as diferentes concentrações dos extratos. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas.



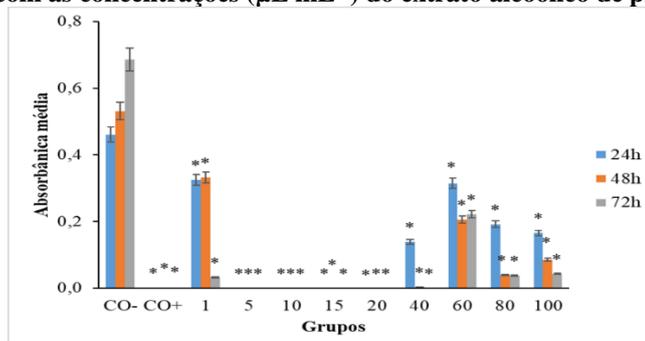
Passado esse tempo, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado meio de cultura com MTT (0,167mg mL⁻¹) e as placas foram incubadas por mais 4 horas. Para a leitura das absorbâncias, após as 4 horas foi descartado o meio de cultura com o MTT e adicionado 100 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. Então as leituras foram realizadas em leitora de microplacas (Thermo Plate) a 560 nm. Os experimentos foram realizados em três repetições independentes.

Para apresentar os resultados foram calculados as médias e desvios padrões das absorbâncias e submetidos à análise de variância (one way ANOVA) e pelo teste de Dunnet, no software Action Stat. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. Os valores percentuais de viabilidade celular (VC) foram estimados pela razão entre a absorbância do tratamento pela absorbância do controle negativo.

3 RESULTADOS

Os dados da Fig. 1 mostram os resultados obtidos com as células HTC tratadas com o extrato alcoólico da própolis. No tempo de 24, 48 e 72 horas todas as concentrações apresentaram efeito citotóxico. Inclusive as viabilidades celulares (Tab. 1) foram menores que 71% (24 horas), 63% (48 horas) e 33% (72 horas), chegando a 0% nas concentrações de 5, 10, 15, 20 µL/mL (24, 48 e 72 horas) e 40 µL/mL (72 horas). Além disso, foi evidente um efeito dependente do tempo de exposição.

Figura 1 – Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato (HTC) tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações (µL mL⁻¹) do extrato alcoólico de própolis.



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; 2,0x10⁴ células por poço. *Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, p<0,05).

Fonte: Autoria própria (2021)

Tabela 1 – Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado de rato (HTC), tratadas com as diferentes concentrações (µL mL⁻¹) de extrato alcoólico de própolis, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	Célula Tumoral Hepática de Ratos		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	0,00	0,00	0,00
1	70,54	62,40	4,59
5	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00
40	30,01	0,56	0,00
60	68,26	38,64	32,25

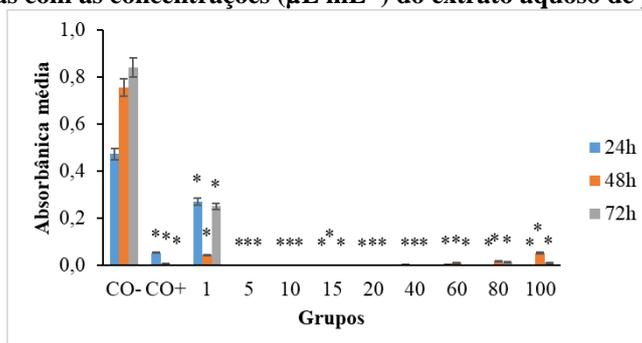


80	41,62	7,25	5,39
100	35,87	16,05	6,30

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.
Fonte: Aatoria própria (2021).

Os dados da Fig. 2 mostram os resultados das absorvâncias médias obtidas com as células tumorais hepáticas de *R. norvegicus* tratadas com o extrato aquoso de própolis. A análise estatística mostrou que todas as concentrações (1-100 $\mu\text{L mL}^{-1}$), em todos os tempos de avaliação (24, 48 e 72 horas), apresentaram absorvâncias médias muito baixas, indicando efeito citotóxico deste composto para as células tumorais HTC. Inclusive, as viabilidades celulares (Tab. 2) foram menores que 57% (24 horas), 7% (48 horas) e 30% (72 horas), atingindo viabilidades mínimas de 0% para as concentrações de 5, 10, 15, 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (24, 48 e 72 horas), 60 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (72 horas), 80 e 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (24 horas).

Figura 2 – Absorbância média e desvio-padrão de células tumorais de fígado de rato (HTC) tratadas por 24, 48 e 72 horas com as concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) do extrato aquoso de própolis.



CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo; $2,0 \times 10^4$ células por poço. *Resultado estatisticamente diferente do controle negativo (Teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Fonte: Aatoria própria (2021)

Tabela 2 – Percentual de viabilidade de células (VC) tumorais de fígado de rato (HTC), tratadas com as diferentes concentrações ($\mu\text{L mL}^{-1}$) de extrato aquoso de própolis, por 24, 48 e 72 horas, pelo teste do MTT.

Grupos	Célula Tumoral Hepática de Ratos		
	VC [%]		
	24 h	48 h	72 h
CO-	100,00	100,00	100,00
CO+	10,95	0,63	0,00
1	56,98	5,59	29,75
5	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00
40	0,11	0,00	0,00
60	0,20	1,36	0,00
80	0,00	2,02	1,31
100	0,00	6,75	0,92

CO-: Controle Negativo; CO+: Controle Positivo.
Fonte: Aatoria própria (2021).

Roberto (2009), avaliando o potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde, demonstrou que este extrato é capaz de reduzir a indução de danos, promovidos por agentes genotóxicos e mutagênicos, sobre as células HTC. Da Silva (2009) estudou o potencial in vitro hepatoprotetor e genoprotetor do extrato



hidroetanólico da própolis vermelha produzida por abelha (*Apis mellifera*), e mostrou que este não causou toxicidade hepática e exerceu efeito hepatoprotetor frente ao dano hepático induzido pela tioacetamida.

4 CONCLUSÃO

Assim, os resultados apresentados no presente estudo mostram que os extratos da própolis apresentaram efeitos citotóxicos para as células tumorais de fígado de rato, indicando que este alimento funcional merece destaque na busca e identificação de novas moléculas a serem utilizadas no tratamento do câncer.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da universidade tecnológica federal do paraná/brasil.

REFERÊNCIAS

- CHEN, C.N.; HSIAO, C.J.; LEE, S.S.; GUH, J.H.; CHIANG, P.C.; HUANG, C.C.; HUANG, W.J. Chemical modification and anticancer effect of prenylated flavanones from Taiwanese propolis. **Natural Product Research**, v. 26, n. 2, p. 116–124. 2012. doi:10.1080/14786419.2010.535146
- DA SILVA, Jardel Bezerra. **Potencial Hepatoprotetor e Genoprotetor da Própolis vermelha produzida por abelha (*Apis mellifera*) no Rio Grande do Norte, Brasil**. v. 1, 86 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural Do Semi-Árido, 2018. Disponível em <
https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7474750# > Acessado em 25 de julho de 2021.
- DORNELAS, C.A.; FECHINE-JAMACARUII, F.V.; ALBUQUERQUE, I.L.; MAGALHÃES, H.I.F.; DE SOUZA, A.J.S.; ALVES, L.A.; DE ALMEIDA, P.R.C. DE LEMOS, T.L.G.; DE CASTRO, J.D.V.; MORAES, M.E.A. MORAES, M. O. Chemoprevention with green propolis green propolis extracted in L-lysine versus carcinogenesis promotion with L-lysine in N-Butyl-N-[4 hydroxybutyl] nitrosamine (BBN) induced rat bladder cancer. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 185–192. 2012b. doi:10.1590/s0102-86502012000200015
- ENDO, S.; MATSUNAGA, T.; KANAMORI, A.; OTSUJI, Y.; NAGAI, H.; SUNDARAM, K.; EL KABBANI, O.; TOYOOKA, N.; HARA, A. Selective Inhibition of Human Type-5 17 β Hydroxysteroid Dehydrogenase (AKR1C3) by Baccharin, a Component of Brazilian Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 716–721. 2012. doi:10.1021/np201002x
- HEHLGANS, S.; LANGE, I.; EKE, I.; KAMMERER, B.; CORDES, N. Human head and neck squamous cell carcinoma cell lines are differentially radiosensitised by the honeybee product Propolis. **International Journal of Radiation Biology**. v. 87, n. 3, p. 243–53. 2011.
- ILHAN-AYISIGI, E.; ULUCAN, F.; SAYGILI, E.; SAGLAM-METINER, P.; GULCE-IZ, S.; YESIL-CELIK TAS, O. Formulação nanovesicular de própolis e efeitos citotóxicos em um modelo esferóide 3D de câncer de pulmão. **Jornal da Ciência da Alimentação e Agricultura**, 2020. doi:10.1002 / jsfa.10400
- MACIEL, F.F.C.; SILVA, E.B.; LIMA, R.; OLIVEIRA, N.D.; DANTAS, E.N.A.; CORDEIRO, S.A.; SOUZA, G.S.F.; MACEDO, N.L.S.; OLIVEIRA, D.A.; DONATO, N.R. Alimentos Funcionais E Câncer de Mama: Breve Revisão. **International Journal of Nutrology**. 2018. DOI: 10.1055/s-00381674376.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).



- PATEL, S. Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 3, p. 245–268. 2015. doi:10.3109/19390211.2015.1008614
- PEREIRA, D.S.; FREITAS, C.I.A.; FREITAS, M.O.; MARACAJÁ, P.B.; SILVA, J.B.A.; SILVA, R.A.; SILVEIRA, D.C. **Histórico e principais usos da própolis apícola. Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 01-21, 2015.
- PETERMANN, A.P.M.; JARDIM, B.C.; GOMES, F.S.; GALINDO, F.L.; COUTO, S.G. **Armazém da Saúde: Caderno de orientações**. 1. reimp. INCA, Rio de Janeiro, 2011.
- ROBERTO, Matheus Mantuanelli. **Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde e de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae), por meio de sistema-teste de Allium e células de mamíferos (HTC)**. 2009. 116 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009. Disponível em <<http://hdl.handle.net/11449/87737>> Acessado em 25 de julho de 2021.
- SAIKAWA, Y.; KUBOTA, T.; FURUKAWA, T.; SUTO, A.; WATANABE, M.; KUMAI, K.; ISHIBIKI, K.; KITAJIMA, M. Single-cell Suspension Assay with an MTT End Point Is Useful for Evaluating the Optimal Adjuvant Chemotherapy for Advanced Gastric Cancer. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 85, n. 7, p. 762–765. 1994. doi:10.1111/j.1349-7006.1994.tb02426.x
- SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–29, 2015. doi:10.1155/2015/206439
- SOUZA, J.A.; SOUZA, E.F.M.; MODRO, A.F.H.; PORTO, W.S.; OLIVEIRA, D.L.A apicultura em Rondônia (Amazônia legal): estudo de caso sobre o arranjo produtivo local da apicultura no cone sul. **Revista Estudo & Debate**, Lajeado, v. 23, n. 2, 2016.
- VALENTE, M.J.; BALTAZAR, A.F.; HENRIQUE, R.; ESTEVINHO, L.; CARVALHO, M. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 86–92. 2011. doi:10.1016/j.fct.2010.10.001
- WATANABE, M.A.E.; AMARANTE, M.K.; CONTI, B.J.; SFORCIN, J.M. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 11, p. 1378–1386, 2021. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01331.x
- WU, J.; OMENE, C.; KARKOSZKA, J.; BOSLAND, M.; ECKARD, J.; KLEIN, C. B.; FRENKEL, K. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. **Cancer Letters**, v. 308, n. 1, p. 43–53. 2011. doi:10.1016/j.canlet.2011.04.012