



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

MANUELA COSTA DE MENEZES

**POTENCIAL FOTOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA
PRODUZIDA POR *APIS MELLIFERA* NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

MOSSORÓ – RN

2019

MANUELA COSTA DE MENEZES

**POTENCIAL FOTOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA
PRODUZIDA POR *APIS MELLIFERA* NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como requisito final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista-UFERSA

MOSSORÓ – RN

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

M541p Menezes, Manuela Costa de.
POTENCIAL FOTOPROTETOR E GENOPROTETOR DA
PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA POR APIS MELLIFERA NO
SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL /
Manuela Costa de Menezes. - 2019.
46 f. : il.

Orientador: Jael Soares Batista.
Coorientador: Carlos Iberê Alves Freitas.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2019.

1. espectrofotometria. 2. fotoproteção. 3.
genoproteção. 4. extrato de própolis. 5. própolis
vermelha. I. Batista, Jael Soares, orient. II.
Freitas, Carlos Iberê Alves, co-orient. III.
Título.

MANUELA COSTA DE MENEZES

**POTENCIAL FOTOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA
PRODUZIDA POR *APIS MELLIFERA* NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

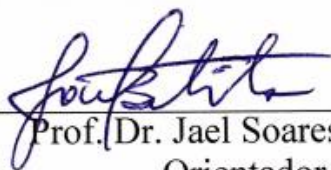
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, como requisito final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista - UFERSA

APROVADO EM: 20.12.2019

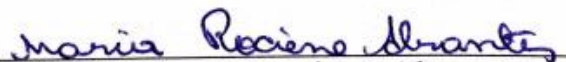
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Jael Soares Batista
Orientador



Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas
Co-orientador



Profa. Dra. Maria Rociene Abrantes

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MANUELA COSTA DE MENEZES – Nascida no município de Fortaleza, CE, no dia 29 de novembro de 1993, filha de Moema Samya Barreira Costa e Homero Vergolino de Menezes Filho. Concluiu o ensino médio em 2011, no Colégio 7 de Setembro. Graduiu-se em Medicina Veterinária em junho de 2017 pela UFERSA. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq, desenvolvendo trabalhos na área de diagnóstico por imagem em animais de companhia. Foi monitora voluntária de Anatomia dos Animais Domésticos I durante 5 semestres e monitora bolsista por 3 semestres. Em janeiro de 2018 ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGA/UFERSA), tendo como linha de pesquisa Sanidade Animal.

*À minha mãe, Moema Sâmya Barreira Costa, por
sempre acreditar em mim e não medir esforços
para eu chegar sempre mais longe.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus, pois sem Ele nada faz sentido. É onde buscamos forças quando as coisas estão desmoronando.

Gostaria de agradecer a minha mãe, Moema Sâmya Barreira Costa, por toda a força que tem me passado ao longo desses 7 anos longe de casa. Sem a senhora nada disso estaria sendo realizado, nada. Você é a pessoa mais importante desse mundo pra mim. Te amo demais (chega dói). Obrigada parece tão pouco..! One, two, three.

A meu pai, Homero Vergolino de Menezes Filho, pelo jeito único e peculiar de ensinar as filhas sobre o mundo. O senhor é um ótimo pai, desculpe minha ausência. Vamos tentar marcar mais momentos juntos.

A minha avó de coração, Maria Nilza (*in memorian*), por todo o cuidado cedido a mim no tempo da infância e pelo melhor doce de banana do mundo. Sinto muita saudade da senhora.

As minhas irmãs, Luciana, Marcela, Mariana e Marília, muito obrigada por todo o apoio, por toda a paciência, por toda a cumplicidade. Nós somos como os dedos da mão! Eu amo vocês.

Aos meus sobrinhos, Artur e Antônio, por serem crianças maravilhosas e inteligentes. Vocês irão longe, meninos! Tia Manu estará sempre presente, pronta para ajuda-los.

A todos os animais que já estiveram na minha vida, cada um de vocês foi muito especial pra mim. Hoje, esse amor está presente na forma de Penny, Giulia, Olivia e Maluquete.

As minhas amigas de Fortaleza, Bárbara, Jade, Marília e Mariana, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e que continuam me amando mesmo eu estando muito distante.

As minhas amigas do colégio, Débora e Marina, por todo o companheirismo e apoio. Vocês são pessoas incríveis pra mim. Obrigada, amo vocês!

A meu companheiro de graduação, de mestrado, de festa, de cozinha, de vida, Igor Renno Guimarães Lopes, por toda a paciência durante esses 2 anos longos e apertados de mestrado, a gente sabe que não foi fácil, né?! Obrigada por se fazer presente na minha vida em vários aspectos. Te amo!

Ao meu amigo Hudson de Queiroz Monteiro, que sempre esteve ao meu lado me dando forças para continuar e que nunca me deixou desistir.

As minhas amigas, Caroline e Liana, por serem minha saudade diária em Mossoró. Amo vocês, saudade do grupo de estudo mais estourado do mundo “Trombina-Like”.

A minha amiga-irmã Telma Sousa, que sempre me ajudou com palavras positivas. Apesar da distância sei que posso contar com você sempre.

Aos colegas do laboratório de patologia animal, Natanael, Bruna, Herbeson, Emerson, Renato e Dani. Vocês são pessoas maravilhosas, com um futuro incrível pela frente. Acreditem sempre no potencial de vocês! Estudem, deem sempre o melhor. Vocês chegarão longe, e eu estarei de pé aplaudindo o sucesso! Um abraço do tamanho do mundo, e contem comigo pra tudo!

Aos meus amigos do mestrado, Andressa, João Paulo, Luan, Paulo Matheus, Samuel, por escutarem todo o perrengue da vida de mestrando e compartilharem perregues também. Vocês são pessoas incríveis, espero que a distância não seja capaz de acabar nossa amizade. Quero encontrar vocês ainda!

Aos amigos que Mossoró me deu, Silene, Kaio, Karydja, Danilo, Cintia, Filho e Jerson, Victor e Erbênia. Vocês se tornaram muito importantes pra mim. Obrigada por tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jael Soares Batista. Professor, obrigada por ter aceitado trabalhar comigo. Espero poder ajudar o senhor em muitas coisas. Sinto orgulho de ter sido sua orientada, afinal de contas, o senhor é um cara muito inteligente. Espero não ter causado uma impressão ruim, pois a vontade de aprender com o senhor só aumentou! Obrigada.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas. Professor, o senhor é um verdadeiro paizão. Sempre disposto a ajudar os alunos, isso é lindo. Obrigada por ser essa pessoa de um coração tão bom, que consegue acalmar com palavras. Obrigada pelos puxões de orelha e pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Wirtton Peixoto Costa, por ter sempre acreditado no meu potencial. Obrigada por toda a confiança depositada em mim ao longo desses anos (não precisa dizer quantos kkk). O senhor acreditou em mim e me acolheu de uma forma muito amigável. Devo muito ao senhor, obrigada! Espero poder retribuir.

A Profa. Dra. Maria Rociene, por toda a dedicação com os alunos. Já falei várias vezes e não canso, você é exemplo. Sempre muito prestativa, muito inteligente e gosto muuuuito de você apesar dos seus 400 slides (kkkkk vai ficar pra sempre). Um beijo enorme e obrigada pelo apoio!

Ao Prof. Dr. José Fernando Gomes de Albuquerque, a quem eu serei sempre eternamente grata por ter sido tão bem recebida no Laboratório de Anatomia Veterinária, onde permaneci durante toda a graduação. Sinto muita saudade. Obrigada por tudo.

Aos demais professores e funcionários da instituição. Obrigada a todos pela contribuição que deram para a minha formação profissional e pessoal. Um abraço bem apertado em cada um de vocês.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os animais que participaram do experimento, e que me ajudaram na construção desse trabalho.

A UFRSA por me proporcionar os meios necessários para a minha formação e crescimento profissional.

POTENCIAL FOTOPROTETOR E GENOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA POR *APIS MELLIFERA* NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL. Menezes, Manuela Costa de. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2019.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de fenóis, flavonóides totais, bem como as atividades antioxidante, genoprotetora e fotoprotetora do extrato etanólico de própolis vermelha produzido por *Apis mellifera*. Diferentes concentrações do extrato foram avaliadas *in vitro* por espectrofotometria. O efeito fotoprotetor do extrato foram avaliados *in vivo* em 30 ratos Wistar divididos em três grupos: Grupo I - a pele não recebeu aplicação tópica do extrato e não foi submetida à irradiação ultravioleta; Grupo II - a pele não foi submetida à aplicação tópica de extrato e foi irradiada; Grupo III - a pele foi submetida à aplicação tópica de extrato e foi irradiada. A pele foi avaliada macroscopicamente e a densidade de células inflamatórias, mastócitos, células necróticas e fibras de colágeno foram quantificados. O extrato apresentou altos teores de fenóis e flavonóides com capacidade antioxidante e genoprotetora, protegendo a pele da irradiação. No grupo II, foram observados eritemas, bolhas e crosta superficial. Não houve diferenças significativas nos valores médios da densidade de mastócitos e fibras colágenas não diferiram entre os grupos I e III. Concluiu-se que o extrato etanólico da própolis vermelha exerceu efeitos genoprotetores e fotoprotetores, promovendo absorvências satisfatórias da radiação ultravioleta e foi capaz de proteger a pele das lesões induzidas pela radiação UVB.

Palavras-chave: espectrofotometria, fotoproteção, genoproteção, extrato de própolis, própolis vermelha.

PHOTOPROTECTIVE AND GENOPROTECTIVE POTENTIAL OF RED PROPOLIS FROM APIS MELLIFERA IN RIO GRANDE DO NORTE SEMIARID REGION, BRAZIL. Menezes, Manuela Costa de. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2019. (Dissertation)

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the levels of phenols, total flavonoids, as well as the antioxidant, genoprotective and photoprotective activities of the red propolis ethanolic extract produced by *Apis mellifera*. Different concentrations of the extract were evaluated in vitro by spectrophotometry. The photoprotective effect of the extract was evaluated in vivo in 30 Wistar rats divided into three groups: Group I - the skin received no topical application of the extract and was not submitted to ultraviolet irradiation; Group II - the skin was not subjected to topical application of extract and were irradiated; Group III - skin underwent topical application of extract and were irradiated. The skin was evaluated macroscopically and the density of inflammatory cells, mast cells, necrotic cells and collagen fibers was quantified. The extract presented high levels of phenols and flavonoids with antioxidant and genoprotective capacity, protecting the skin from irradiation. In group II, erythemas, blisters and superficial crust were observed. No significant differences in mean values of mast cell density and collagen fibers did not differ between groups I and III. It was concluded that the ethanolic extract of red propolis exerted genoprotective and photoprotective effects by promoting satisfactory absorbances of ultraviolet radiation and was able to protect the skin from lesions induced by UVB irradiation.

Keywords: spectrophotometry, photoprotection, genoprotection, propolis extract, red propolis

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Hay content, total flavonoids, and antioxidant activity of *Apis mellifera* red propolis obtained from Rio Grande do Norte, Brazil.. 40

Table 2. Mean $\pm$ standard deviation of DNA damage indices (idDNA), analyzed by comet assay to evaluate the genoprotective effect of the red propolis ethanolic extract, after exposure of L929 cells (fibroblasts), in three different concentrations of the extract, hydrogen peroxide (H₂O₂) and sterile distilled water..... 40

Table 3 - In vitro photoprotective activity of the ethanol extract of *Apis mellifera* red propolis obtained in Rio Grande do Norte, Brazil, in different concentrations.. 41

Table 4 - Mean values of standard deviation of the density of the histological parameters of the skin of Wistar rats, in the different experimental groups. (G1), unirradiated and untreated skin with concentrated extract of red propolis; (G2) skin submitted to UVB and (G3) irradiation submitted to topical application of the propolis extract and irradiated with UVB...41

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Macroscopic appearance of the skin of *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, Wistar line, in the experimental groups. Non-irradiated and untreated skin with concentrated extract of red propolis (G1), skin submitted to UVB (G2) irradiation and skin submitted to the topical application of the propolis extract and irradiated with UVB (G3). In G1 and G3 there is no change. In G2, it was observed skin with intense hyperemia, presence of bubbles coated thin superficial crust of reddish coloration, moderate opacity, aspects aspect dry, coriaceous, surface rough and rough 43
- Figura 2 - Skin photomicrographs of Wistar rats stained with hematoxylin and eosin, in the different experimental groups. (G1), unirradiated and untreated skin with concentrated extract of red propolis; (G2) skin subjected to UVB irradiation and (G3), skin submitted to the topical application of the propolis extract and irradiated with UVB. In pictures A and D, skin with normal histological appearance is observed. Image B presents subepidermal clefts, separation of the epidermis with the dermis, in addition to necrotic cells and vacuoles in the dermis. Image C shows vascular coagulation, hemorrhage, interstitial edema and dissociation of collagen fibers. Obj. Scale bar = 200µm..... 44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. PRÓPOLIS VERMELHA	20
2.1.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	21
2.2. EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA	17
2.3. ATIVIDADE FOTOPROTETORA E GENOPROTETORA	19
3. OBJETIVOS	24
3.1. OBJETIVO GERAL	24
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
5. CAPÍTULO I - Photoprotective and genoprotective potential of red propolis from Apis mellifera in Rio Grande do Norte semiarid region, Brazil	29
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural elaborado através de substâncias coletadas por abelhas, *Apis mellifera*, a partir de diversas partes das plantas, como gemas vegetativas, botões florais e exsudados resinosos misturados com enzimas de abelha, pólen e cera (CASTRO et al., 2007; SFORCIN & BANKOVA, 2011). Na colmeia a própolis é utilizada para revestir as paredes internas, selar rachaduras e fendas (GREENAWAY; SCAYSBROOK; WHATELY 1990), no preparo de alvéolos assépticos para a postura da abelha rainha, cobrir carcaças de insetos intrusos daninhos que morreram dentro da colmeia, evitando sua decomposição, além de atuar como isolante térmico (ZUNINI et al., 2010; CARVALHO-ZILSE & NUNES-SILVA, 2012; TORETI et al., 2013).

Devido à diversidade de plantas encontrados no Brasil, a própolis brasileira desperta interesse internacional por possuir excelente qualidade e alta variação que diferem quanto à composição química. Ao todo são classificados 13 tipos (PARK et al., 2004; CUETO, 2011). O último tipo classificado é a própolis vermelha, descoberta, primeiramente, em colmeias localizadas nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia, situados no Nordeste do Brasil (DAUGSCH et al., 2006; ALENCAR et al., 2007). A própolis brasileira destaca-se entre os produtos naturais por apresentar diversas propriedades biológicas (LIMA et al., 2018), como atividade anti-inflamatória, antibacteriana, anti-tumoral, porém, ainda é pouco explorada em algumas regiões do Brasil (CASTALDO & CAPASSO, 2002; PEREIRA et al., 2002).

A própolis vermelha é produzida a partir do exsudato vermelho da superfície dos buracos feitos pelos insetos no tronco de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub., popularmente conhecida como “rabo-de-bugio”. Na agricultura e na indústria de cosméticos é utilizado para a elaboração de xampus e sabonetes, e na indústria alimentícia, sendo usada em bebidas, alimentos saudáveis e suplementos nutricionais; (CASTALDO & CASSAPO, 2002; ORDÓÑEZ et al., 2011; ALVES & KUBOTA, 2013; DAUGSCH et al., 2006; LI et al. 2008). Ela apresenta diversos compostos em sua composição química, dos quais se destacam isoflavana e flavonoides, álcoois triterpênicos, derivados de fenilpropeno (TRUSHEVA et al., 2006), chalconas (PICCINELLI et al., 2011) e benzofenonas polipreniladas (LÓPEZ et al., 2015; PICCINELLI et al., 2011; TRUSHEVA et al., 2006), conferindo a essa substância inúmeras propriedades biológicas que tem despertado interesse nacional e internacional como

subsídio para o combate e prevenção de uma série de doenças (em animais ou seres humanos).

Com o crescente número de casos de câncer de pele em todo mundo, a preocupação com a proteção desse órgão vem aumentando. A busca por substâncias com caráter fotoprotetor tem sido bastante estimulada pela indústria cosmética com intuito de incorporá-los a protetores solares, porém, para que isso ocorra, essas substâncias devem apresentar moléculas com estruturas semelhantes às dos filtros solares sintéticos e não causarem danos ao material genético da célula (FONSECA JR; CASTILHO; SILVA, 2015).

Tendo em vista a importância de se pesquisar amostras de própolis vermelha em áreas que nunca foram estudadas e considerando que a composição da própolis vermelha depende da vegetação, clima da área e espécie de abelha, faz-se necessário caracterizar as amostras de própolis vermelha coletadas em uma região do semi-árido do Rio Grande do Norte (RN) e identificar a atividade antioxidante e propriedades biológicas tais como; em seu efeito genoprotetor e fotoprotetor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRÓPOLIS VERMELHA

As abelhas produzem diversos produtos e entre eles, a própolis desempenha um papel importante na defesa da colmeia frente a invasores, manutenção da temperatura e sanidade interna contribuindo para a permanência desses insetos sociais e/ou “superorganismo” (colmeia) no ecossistema (REIDEL, 2014).

A palavra própolis é derivada do grego e significa em defesa da comunidade (pro-, em função, e poli - cidade ou comunidade) (MIGUEL & ANTUNES, 2011). As abelhas usam a própolis na proteção contra insetos e microrganismos, na mumificação de invasores, no reparo de danos à colmeia e no preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha (BANKOVA, 2005). Até 2006, existiam 12 tipos de própolis, quando, Dausch e colaboradores (2006), classificaram esse novo tipo de própolis (vermelha) da costa do nordeste, como própolis do grupo 13. Na produção de própolis vermelha do nordeste, as abelhas a coletam de diversas árvores e arbustos que ocorrem no litoral. Possui como prováveis fontes a *Rizophora mangle* (mangue vermelho), *Schinus terebentifolius* (Aroeira) e a *Dalbergia ecastophyllum* (L.), sendo essa ultima, a principal fonte da própolis utilizada no presente estudo.

Os tipos de própolis variam de acordo com sua coloração que é dependente de sua procedência, pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo de seu tipo e idade. Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra e seu potencial biológico se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes (MARCUCCI, 2001).

A composição química da própolis é variável e inclui em sua maior parte, flavonoides e outros ésteres fenólicos e seus derivados, compostos aromáticos, minerais e vitaminas (CARDINAULT et al., 2012). Uma série de propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a este produto apícola, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória e até mesmo antiácida; com usos evidenciados pelas tradições populares (SFORCIN & BANKOVA, 2011). Dentre as muitas atividades farmacológicas atribuídas a própolis, algumas têm sido relatadas e confirmadas cientificamente, tais como: anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiparasitária, cicatrizante e antimicrobiana (SAWAYA et al., 2009; FABRIS et al., 2013).

A própolis brasileira possui grande variabilidade em sua composição química, se diferenciando da composição encontrada na própolis, que em virtude da restrita diversidade vegetal em seu território, não consegue apresentar os mesmos índices da própolis encontrada no Brasil, País caracterizado por apresentar abundante diversidade vegetal (CASTRO et al., 2007; NUNES & GUERREIRO, 2012).

2.1.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICAS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A utilização de extratos naturais afigura-se uma alternativa bastante promissora aos agentes antimicrobianos convencionais, podendo tornar os têxteis biofuncionalizados mais biocompatíveis e consequentemente, com maior aplicação na área da saúde. Além de se ter atrativo do ponto de vista ecológico, a utilização de têxteis contendo extratos naturais apresenta uma funcionalidade muito desejada, uma vez que o têxtil está em contato direto com a pele. Uma opção deste tipo de extrato seria a própolis (RELVA, 2012).

O uso de produtos naturais como agentes antisolares, foi descrito inicialmente por Proserpio, em 1979, onde este faz uma analogia estrutural das substâncias ativas presentes em algumas plantas com as estruturas bases de alguns dos principais filtros solares sintéticos. Foi observado que estes extratos apresentavam uma absorção que os levaria a serem empregados junto aos filtros sintéticos, levando a um aumento do seu FPS, além de garantir as ações emolientes e adstringentes, entre outras, dependendo do produto natural empregado. De acordo com Naggar e colaboradores (2016), a variedade de compostos biologicamente ativos, principalmente de compostos fenólicos, faz com que sejam ressaltadas as propriedades biológicas de uma substância,

Dos estudos realizados na própolis, foram identificados mais de 300 compostos sendo principalmente polifenóis, destes a maior parte são flavonóides (pinostrobina, quercetina, pinobanquesina), aos quais estão associados ácidos fenólicos (ácidos benzoico, gálico, ferúlico e cafeico), vitaminas (vitamina C e E, pró-vitamina A e vitaminas do grupo B), ácidos gordos não saturados, compostos terpênicos e minerais (cálcio, potássio, sódio, manganês, ferro, alumínio, fósforo, silício, vanádio e estrôncio) (REIDEL, 2014).

A composição química é muito complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas e com o período de coleta da resina. Além disso, a variação genética das abelhas rainhas também influencia na composição

química. Dessa forma, alguns componentes estão presentes em todas as amostras de própolis, enquanto outros estão somente em própolis derivadas de espécies particulares de plantas. A composição básica da própolis é de 55% de resinas e bálsamo, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais e 5 % de pólen e, em diferentes amostras, foram identificadas mais de 300 substâncias, dentre as quais podemos citar flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos, cetonas, terpenóides, esteróides, aminoácidos, fenilpropanóides, ácidos graxos, hidrocarbonetos e vários outros compostos em pequenas proporções (NIKOLAEV, 1978; ASHRY & AHMAD, 2012).

Os flavonóides são pigmentos das plantas sintetizados a partir da fenilalanina. Apresentam-se geralmente sob uma variedade de cores encontradas nas pétalas das flores, sendo que a grande maioria emite uma fluorescência brilhante quando excitados pela luz ultravioleta (UV) e são onipresentes nas células das plantas verdes. São utilizados pelos botânicos para classificação taxonômica. Eles regulam o crescimento das plantas pela inibição da exocitose de auxina, assim como pela indução de expressão gênica e também influenciam outras células de várias formas (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonoides inibem ou matam muitas cepas bacterianas, inibem importantes enzimas virais, como a transcriptase reversa e a protease e destroem alguns protozoários patogênicos. Ainda assim, a sua toxicidade às células animais é baixa. A ingestão diária de flavonoides com a alimentação normal, especialmente frutas e legumes, corresponde a cerca de 1,0 – 2,0 g. Os médicos têm aumentado às indicações de flavonoides purificados para tratar muitas doenças comuns, devido a sua habilidade para inibir enzimas específicas, simular alguns hormônios e neurotransmissores e captar radicais livres (HAVSTEEN, 2002; BERRETTA, 2007).

2.2. EFEITOS DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

O maior órgão do corpo humano é a pele, que além de recobrir toda a superfície corporal também auxilia na proteção contra o ambiente externo. Apresenta funções importantes, como a neuro-hormonal e a imunológica, auxilia na homeostasia, na regulação térmica e metabólica e desempenha papel importante na aparência estética. Este órgão é formado pela epiderme, considerada a porção mais superficial que funciona como barreira externa; pela derme, na qual estão localizadas as glândulas sebáceas e os folículos pilosos; e

pela hipoderme ou tecido subcutâneo, que une a pele por meio da derme e possui muitas células adiposas que permitem o movimento da pele sobre o restante do corpo (NICASTRI, 2012).

A radiação ultravioleta (RUV) que é emitida pelo sol, é responsável pela maioria das mudanças fotocutâneas provocadas na pele (KHURY & SOUSA, 2010). Essa radiação encontra-se entre a faixa de comprimento que vai de 100nm a 400nm, onde é subdividida em radiação UVC (100-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (UVA, 320-400 nm) (EPSTEIN, 1990), sendo essa última também subdividida em UVA 1 (340-400 nm) e UVA 2 (320-340 nm). Cada uma dessas ondas apresentam características de propagação e efeitos fisiológicos distintos (GARCIA et al., 1991; MATHEUS & KUREBAYASHI, 2002).

As radiações UVA são as de maior comprimento de onda e responsável pela pigmentação cutânea imediata, pois provoca a fotoxidação da leucomelanina, presente nas células das camadas externas da epiderme, levando ao bronzeamento (KIMBROUGH, 1997; PAOLA & RIBEIRO, 1998), além disso, elas originam radicais livres oxidativos que são responsáveis pelo envelhecimento precoce (fotoenvelhecimento ou envelhecimento actínico), doenças fotossensibilizantes e também contribuem para o desenvolvimento do câncer de pele (PAOLA & RIBEIRO, 1998; MASSON & SCOTTI, 2003).

A radiação UVB atinge toda a superfície terrestre após atravessar a atmosfera. Possui alta energia e, com grande frequência, ocasiona queimaduras solares. Essa radiação apresenta uma menor penetração na pele devido a sua alta absorção pela epiderme. A exposição frequente e intensa à radiação UVB pode causar queimaduras (vermelhidão e até bolhas), descamação, manchas, lesões no DNA, além de suprimir a resposta imunológica da pele. Desta forma, além de aumentar o risco de mutações fatais, manifestado sob a forma de câncer de pele, sua atividade reduz a chance de uma célula maligna ser reconhecida e destruída pelo organismo (MENDONÇA, 1996; PAOLA & RIBEIRO, 1998).

A radiação UVC é também conhecida como região bactericida. É caracterizada por sua elevada energia, característica que a torna extremamente lesiva aos seres vivos, sendo responsável por efeitos mutagênicos e carcinogênicos. A maioria dos raios UVC são absorvidos pela camada de ozônio, fazendo com que uma menor quantidade dessa radiação atinja a população. Devido a fatores ambientais, a redução na camada de ozônio tem levado a um aumento da radiação UVC na superfície da Terra, ocasionando maior incidência de

queimaduras e, conseqüentemente, câncer de pele (MENDONÇA, 1996; SANTORO, SILVA & KEDOR-HACKMANN, 2001).

Segundo a Instituição Nacional do Câncer (INCA), em 2011, o câncer de pele ocupava a primeira posição dentre todos os tipos de cânceres e apresenta tendência de aumento no número de novos casos em todo o território nacional. No mundo, o câncer de pele é o mais comum, sendo o melanoma, o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular os tipos mais frequentes da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Para o Brasil, estimam-se 85.170 casos novos de câncer de pele não melanoma entre homens e 80.410 nas mulheres para cada ano do biênio 2018-2019. Esses valores correspondem a um risco estimado de 82,53 casos novos a cada 100 mil homens e 75,84 para cada 100 mil mulheres. É o mais incidente em ambos os sexos (INCA, 2017).

Com a constante exposição à raios solares a média de idade dos pacientes com câncer de pele vem diminuindo. Existem dois tipos de câncer de pele, o melanoma e o não melanoma. O melanoma tem origem nas células produtoras de melanina (melanócitos) e é mais frequente em adultos brancos. Pode aparecer em qualquer parte do corpo e, em indivíduos de pele negra, aparece com maior frequência nas regiões mais claras, como palmas das mãos e palmas dos pés. Esse tipo de câncer corresponde a cerca de 3% de todos os tumores malignos registrados no país sendo considerado o mais grave, devido a alta capacidade de provocar metástase. O câncer de pele não melanoma é o mais frequente no Brasil, chegando a 30% de todos os tumores malignos registrados. Quando detectado precocemente apresenta altos percentuais de cura. Dentre os tumores de pele é o mais frequente e de menor mortalidade, porém se não tratado de forma correta pode deixar mutilações bastante expressivas (INCA, 2017). O principal fator de risco para os cânceres de pele melanoma e não melanoma é a exposição excessiva à radiação solar ultravioleta (UV). Outros fatores, como cor de pele, olhos e cabelos claros; história familiar ou pessoal de câncer de pele; o sistema imune debilitado por doenças ou em indivíduos transplantados por causa do uso de imunossupressores (azatioprina e ciclosporina), podem aumentar o risco desenvolver câncer de pele (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Por essa razão, o uso de filtros solares tem sido indicado como uma profilaxia contra os raios ultravioletas (URBACH, 2001).

Devida à ação fotoprotetora, muitos extratos e óleos naturais têm sido empregados na indústria cosmética como protetores solares. Porém, os mesmos devem apresentar moléculas com estruturas semelhantes às dos filtros sintéticos (FONSECA Jr.; CASTILHO; SILVA; 2015). Dessa forma, torna-se imprescindível o estudo de componentes responsáveis por proteger ou minimizar os danos da radiação sobre a pele.

2.3 ATIVIDADE FOTOPROTETORA E GENOPROTETORA

Os protetores solares são produtos que possuem substâncias chamadas filtro solares em suas composições, estes, por sua vez, podem ser de caráter orgânico ou inorgânico. Os filtros orgânicos, ou filtros químicos, podem ser sintéticos ou naturais, e possuem em comum a propriedade de absorver a raios ultravioletas (RUV), diminuindo sua ação sobre o organismo humano. Os filtros inorgânicos, ou filtros físicos, são geralmente óxidos metálicos que oferecem proteção pela reflexão da radiação incidente (FLOR; DAVOLOS; CORREA, 2007). Estas substâncias são chamadas fotoprotetoras por possuírem capacidade de absorver radiações ultravioletas com intuito de minimizar seus efeitos sobre a pele. A primeira substância utilizada com essa finalidade foi descoberta por Wildmark, em 1889, chamada sulfato de quinina acidificado. Em 1891 essa substância foi incorporada em pomadas e loções por Hammer, constituindo o que se considera como o primeiro produto protetor solar químico da história (URBACH, 2001).

Os efeitos genomodificadores são aqueles que estão relacionados ou a proteção do DNA (genoprotetor) ou a danificação do mesmo (genotoxicidade). Substâncias tidas como genoprotetoras são aquelas que, quando usadas, não causam danos ao DNA da célula fazendo com que o risco de mutações seja menor. A geração de dano ao material genético da célula (genotoxicidade) é o evento inicial de muitas morbidades, com destaque para a carcinogênese (KOHATSU et al., 2007; TAJBAKHSI, 2011). A genotoxicidade, ou toxicidade genética, não é uma medida carcinogênica, no entanto, tem se tornado um indicador para mutações celulares, sendo os testes de genotoxicidade utilizados rotineiramente na procura de substâncias tóxicas em medicamentos e também para a descoberta de substâncias genoprotetoras para a prevenção de danos ao DNA (NIWA et al., 2013).

Entre vários compostos fitoquímicos, os flavonóides e os taninos são os que apresentam atividades mutagênicas e antimutagênicas (HORN & VARGAS, 2008). De acordo com Tavares et al. (2006), os flavonóides são os principais componentes responsáveis pelos efeitos mutagênicos e antimutagênicos da própolis. Os autores atribuem ao extrato de própolis, a característica de atuar como um composto com “efeito Janus”, ou seja, pode se comportar como agente genotóxico ou antigenotóxico, dependendo da condição experimental utilizada.

Estudos realizados com a própolis verde no sudeste do Brasil, na cidade de Carvalhópolis-MG, realizado por Roberto (2009), demonstraram não haver atividade mutagênica de extratos etanólicos, mas sim apresentando uma capacidade protetora uma vez que células de mamíferos quando submetidas a um agente comprovadamente mutagênico (Metilmetano Sulfonato - MMS) e incubadas juntamente com o extrato de própolis apresentaram redução de micronúcleos em 86,67%.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial genoprotetor e fotoprotetor da própolis vermelha produzida por *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os teores de fenóis totais e flavanóides do extrato etanólico da própolis vermelha produzida por *Apis mellifera*;
- Avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico da própolis vermelha;
- Avaliar o potencial genoprotetor e fotoprotetor *in vitro* do extrato etanólico da própolis vermelha produzida por *Apis mellifera*;
- Avaliar potencial fotoprotetor *in vivo* do extrato etanólico da própolis vermelha na pele de ratos da linhagem Wistar submetidos à irradiação UVB.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Basal and Squamous Cell Skin Cancer**. Atlanta, 2016. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8818.00.pdf>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2017. Atlanta, 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>.
- ASHRY, E. S.; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 31-39, 2012.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.
- Berretta AA. Fitoterapia como prática integrativa e complementar no SUS. **II Semana Farmacêutica do HC**. Ribeirão Preto, Brasil, 2007
- CARDINAULT, N.; CAYEUX, M. O.; SERT, P. P. La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytothérapie**, v. 10, n. 5, p. 298-304, 2012.
- CARVALHO-ZILSE G.A. & NUNES-SILVA C.G. Threats to the stingless bees in the brazilian Amazon: How to deal with scarce biological data and an increasing rate of destruction, p.147-168. In: Florio R.M. (Eds), **Bees: Biology, Threats and Colonies**. Nova Science Publishers, New York, 2012
- CASTALDO, S., CAPASSO, F. "Propolis, an old remedy used in modern medicine." **Fitoterapia** 73 S1-S6, 2002.
- CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, 2007.
- CASTRO, M. L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512, 2007.
- CUETO, Ana Paula et al. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1800-1806, 2011.
- DA FONSECA JR, E. Q.; DE CASTILHO, R. B.; DA SILVA, G. F. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS ETANÓLICOS DE Aniba canelilla (HBK) Mez. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1.3: 1168-1172, 2015

DAUGSCH, A., MORAES, C., FORT, P., PACHECO, E., LIMA, I., ABREU, J., & PARK, Y. "Própolis vermelha e sua origem botânica." **Mensagem Doce** 89: 2-15, 2006.

EPSTEIN, J.H. Biological effect of sunlight. In: LOWE, N.J.; SHAATH, M.A.; PATHAK, M.A. Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspect. Marcel Dekker, New York (1990).

FABRIS, S. et al. Antioxidant properties and chemical composition relationship of europeans and brazilians propolis. **Pharmacology and Pharmacy**, v. 4, p. 46-51, 2013.

FLOR J, DAVOLOS MR, CORREA MA. Protetores solares. **Quím Nova**. jan/fev; 30(1):153-8. 2007.

GARCIA, S., E.P. SANTOS, M.T.L. LIMA & M.F.S. RAMOS. **Rev. Bras. Cienc. Farmac.** 72: 39-41 ; Kimbrough, D.A. (1997) J. Chem. Educ. 74: 51-53, 1991.

HAVSTEEN, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>.

KHURY, E.; SOUSA, E. B. Protetores Solares. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 22, p.66-78, nov./dez. 2010.

KIMBROUGH, Doris R. The photochemistry of sunscreens. **Journal of chemical education**, v. 74, n. 1, p. 51, 1997.

KOHATSU, A.G.S.; SHIMABUKURO, F. GATTÁSG, J.F. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. **Saúde, Ética & Justiça**, v. 12, n. 1-2, p. 15-21, 2007.

LI, Feng et al. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 5434-5440, 2008.

LOPEZ, BG-C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677-687, 2015.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.

MASSON, Phelippe; SCOTTI, Luciana. Fotoproteção: um desafio para a cosmetologia. **Cosmetics Cosmetics & Toiletries**, p. 42-53, 2003.

MATHEUS, Luiz Gustavo Martins; KUREBAYASHI, Alberto Keidi. **Fotoproteção: a radiação ultravioleta e sua influência na pele e cabelos**. Tecnopress, 2002.

MENDONÇA, V.L.M. Proteção Solar X Fator de Proteção. **Revista Racine**, São Paulo 5:14, 1996.

MIGUEL, Maria Graça; ANTUNES, Maria Dulce. Is propolis safe as an alternative medicine?. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 3, n. 4, p. 479, 2011.

NAGGAR Y.A., SUN J., ROBERTSON A., GIESY J.P. & WISEMAN S. Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian própolis. **J. Apic. Res.** 55(4):305-314, 2016.

NICASTRI, Ana L. **Avanços da Cosmiatria**. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora, 2012.

NIKOLAEV, A. B. A Remarkable Hive Product, Propolis: scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. Bucharest: APIMONDIA Standing Commission on Beekeeping Technology and Equipment, 1978.

NIWA, A. M.; OLIVEIRA, R. J.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of soy phytoestrogens using micronucleus and comet assays of the peripheral blood of mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 519-527, 2013.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 433-438, 2012.

ORDÓÑEZ, Roxana Mabel et al. Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. **Microbiological research**, v. 166, n. 7, p. 578-584, 2011.

PAOLA, M.V.R.V. & M.E. RIBEIRO. Cosm. & Toil. (edição em português) 10(5): 40-50.; Steiner, D. **Rev. Racine**. 41: 4-9. 1998.

PARK, J. H. et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 429-436, 2004.

PEREIRA AS, SEIXAS FRMS, AQUINO NETO FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e s suas perspectivas futuras. **Quim Nova** 25: 321-326, 2002

PICCINELLI, A. L. et al. 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**, v. 59, n. 12, p. 6484-91, 2011.

ROBERTO, M. M. Avaliação do Potencial Antimutagênico de Extrato Etanólico de Própolis Verde e de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por Meio de Sistema-Teste de Allium cepa e Células de Mamíferos (HTC). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 2009.

SANTORO, M.I.R.M., F.C. SILVA, F.C & E.R.M. KEDOR-HACKMANN (2001) *Cosm & Toil.* (edição em português) 13(5): 46-54; Urbach, F. (1997) **J. Photochem.** Photob. 40: 3-7

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Composition and antioxidant activity of propolis from three species of *Scaptotrigona* stingless bees. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, n. 2, p. 37-42, 2009.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

TAJBAKSHI, J. DNA methylation topology: potencial of a chromatin landmark for epigenetic drug toxicology. **Epigenomics**, v.3, n. 6, p.761-70, 2011.

TAVARES, D. C. et al. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 7, p. 1154-1158, 2006.

Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

URBACH F. The historical aspects of sunscreens. **J Photochem Photobiol B Biol.** Nov; 64(2):99-104, 2001.

W. GREENAWAY, T. SCAYSBROOK, and F. R. WHATELY, "The composition and plant origin of propolis: a report of work Oxford," **Bee World**, vol. 71, no. 3, pp. 107–118, 1990.

ZUNINI, M. P. et al. Phenolic contents and antioxidant activity in central-southern Uruguayan propolis extracts. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 55, n. 1, p. 141-146, 2010.

5. CAPÍTULO 1 – Photoprotective and genoprotective potential of red propolis by *Apis mellifera* in Rio Grande do Norte semiarid, Brazil.

Manuela Costa de Menezes¹ | Bruna C. Cesário¹ | Natanael S. Félix¹ | Renato L. B. Silva¹ | Daniela R. F. Sousa¹ | Francisco H. A. Silva¹ | Emerson C. O. Silva¹ | Lorena S. Bezerra² | Victor Hugo V. Rodrigues^{3*} | Carlos Iberê A. Freitas¹ | Jael S. Batista¹

¹ Center for Agricultural Sciences, Federal Rural University of Semiarid, Mossoró, RN.

² Health Science Center, University of Fortaleza, Fortaleza, CE.

³ Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará, Fortaleza, CE.

*Corresponding author: Victor Hugo V. Rodrigues, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Bloco E, Fortaleza, Brazil. Email: victorvieira81@gmail.com

Artigo nas normas do periódico Journal of Apiculture Research
Photoprotective and genoprotective potential of red propolis from *Apis mellifera* in Rio Grande do Norte semiarid region, Brazil

Potencial genoprotetor e fotoprotetor da própolis vermelha por *Apis melífera* no semiárido do
Rio Grande do Norte, Brasil

Abstract

The objective of this study was to evaluate the levels of phenols, total flavonoids, as well as the antioxidant, genoprotective and photoprotective activities of the red propolis ethanolic extract produced by *Apis melífera* no Semiárido do Rio Grande do Norte. Different concentrations of the extract were evaluated *in vitro* by spectrophotometry. The photoprotective effect of the extract was evaluated *in vivo* in 30 Wistar rats divided into three groups: Group I - the skin received no topical application of the extract and was not submitted to ultraviolet irradiation; Group II - the skin was not subjected to topical application of extract and were irradiated; Group III - skin underwent topical application of extract and were irradiated. The skin was evaluated macroscopically and the density of inflammatory cells, mast cells, necrotic cells and collagen fibers was quantified. The extract presented high levels of phenols and flavonoids with antioxidant and genoprotective capacity, protecting the skin from irradiation. In group II, erythemas, blisters and superficial crust were observed. No significant differences in mean values of mast cell density and collagen fibers did not differ between groups I and III. It was concluded that the ethanolic extract of red propolis exerted genoprotective and photoprotective effects by promoting satisfactory absorbances of ultraviolet radiation and was able to protect the skin from lesions induced by UVB irradiation.

Keywords: spectrophotometry, photoprotection, genoprotection, red própolis

Resumo

Objetivou-se avaliar os teores de fenóis, flavanóides totais, além das atividades antioxidante, genoprotetora e fotoprotetora do extrato etanólico da própolis vermelha produzida por *Apis melífera* no Semiárido do Rio Grande do Norte. Diferentes concentrações do extrato foram avaliadas *in vitro* por espectrofotometria. O efeito fotoprotetor do extrato foi avaliado *in vivo* em 30 ratos Wistar distribuídos em três grupos: Grupo I - a pele não recebeu aplicação tópica de extrato e não foi submetida à irradiação ultravioleta; Grupo II - a pele não foi submetida a aplicação tópica de extrato e foram irradiados; Grupo III - pele foi submetida a aplicação tópica de extrato e foram irradiados. A pele foi avaliada macroscópica e quantificou-se a densidade de células inflamatórias, mastócitos, células necrosadas e fibras colágenas. O extrato apresentou altos teores de fenóis e flavonoides com capacidade antioxidante e

genoprotetor, protegendo a pele da irradiação. No grupo II foram observadas eritemas, bolhas e crosta superficial. Não houve diferenças significativas dos valores médios da densidade de mastócitos e fibras colágenas não diferiram entre os grupos I e III. Concluiu-se que o extrato etanólico da própolis vermelha exerceu efeitos genoprotetor e fotoprotetor por promover satisfatórias *absorbâncias* da radiação ultravioleta e foi capaz de proteger a pele das lesões induzida pela irradiação UVB.

Palavras-chave: espectrofotometria, fotoproteção, genoproteção, própolis vermelha.

1 | INTRODUCTION

Natural plant products can act as excellent photoprotectors by inhibiting certain cellular events. Ultraviolet radiation (UVR), which can cause skin damage, may be absorbed, or reflected and/or dissipated from exposed skin, by these photoprotecting plant products (Melo & Siqueira, 2012). Moreover, phenolic and flavonoid compounds contained within these products have antioxidant, anti-inflammatory, and anti-aging properties, thereby corroborating their use in the production of sunscreens (Hanzel et al., 2013).

Propolis is produced by bees from a mixture of pollen, wax, and plant resins to protect their hives from pathogenic microorganisms (Bankova, 2005). A newly discovered Brazilian propolis, known as red propolis, was described because of its reddish pigment. This red propolis was the 13th type of propolis cataloged in Brazil. It has in its chemical composition isoflavan, flavonoids and triterpene alcohols. Red propolis is produced from the red exudate found at the surface of holes made by insects in the trunk of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. This plant is popularly known as ‘howler's tail’ and is found mostly in northeastern Brazil, in states such as Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, and Paraíba (BUENO-SILVA et al., 2013).

Recent studies by Almeida et al. (2019) demonstrated that *in vitro* red propolis from northeastern Brazil promotes increased sun protection factor (SPF) when added to UVA-UVB photoprotective formulations. The authors suggest the indication of red propolis in formulations that act as sunscreen. To complement this information, studies are needed to evaluate the photoprotective capacity of red propolis *in vivo*. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of topical application of concentrated red propolis extract, produced by *Apis mellifera* in the semiarid region of Rio Grande do Norte, Brazil, on the skin of Wistar rats exposed to URV (Ultraviolet radiation) irradiation, as well as to evaluate the effect of red propolis genoprotection in L929 cells.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Acquisition and elaboration of propolis extract

The propolis used in this experiment was collected in March 2018 in an apiary belonging to the Beekeepers Association, located in Parnamirim (5.9061° S, 35.2604° W, 65 meters above sea level), in the state of Rio Grande, Northern Brazil. For the preparation of the extracts, 200 g of the propolis was subdivided into small portions. These portions were dried in an air circulation oven at 40°C for 48 h and then crushed in a domestic blender. Cold maceration was performed at a ratio of 1: 6.25 (m/v); i.e., for each 1 g of crushed propolis, 6.25 mL of 70° Gay Lussac (GL) cereal alcohol was used, according to the method employed by Garcia et al. (2004). In the next step, filtering of the supernatant was performed on filter paper to retain insoluble particles. The obtained ethanolic extract was then rotoevaporated at 40°C to leave a sticky, concentrated cream.

2.2 | Estimation of total phenol, total flavonoid, and antioxidant content

The total phenol content was determined according to the Folin Ciocalteu methodology, with the results being expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per 100 g of propolis (Singleton et al., 1999). The determination of total flavonoid content was performed according to the method described by Salatino et al. (2011), using a standard curve with quercetin. Results were expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per 100 g of propolis. The antioxidant capacity of the extract was tested with the in vitro photolorimetric method of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine), as described by Mensor et al. (2001). The scavenging capacity of the DPPH radical was represented by the IC₅₀ values (%) of the sample compared to quercetin, which was used as a reference standard.

2.3 | In vitro photoprotective potential evaluation

The photoprotective potential of red propolis was evaluated by the in vitro spectrophotometric method developed by Mansur et al. (1986). This method was used to determine the maximum wavelength (λ max) and maximum absorbance (A max) of the red propolis extract diluted with PA (Merck) absolute ethyl alcohol at dilutions of: 100.0 mg/L, 50.0 mg/L, 25.0 mg/L, 12.5 mg/L, 6.25 mg/L, and 3.14 mg/L. The spectrophotometric readings were taken on the FEMTO spectrophotometer, model 800XI, in the range of 290 to 320 λ / nm, to verify the absorption in the ultraviolet A and B regions (UVA and UVB). Absolute ethyl alcohol PA was used as the white solvent and the experiment was performed in triplicate.

2.4 | In vitro genoprotective potential evaluation

The genoprotective effect of red propolis was evaluated by the L929 (0.7×10^5 cells/mL) fibroblast comet assay, grown in DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media, GIBCO®), supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic (penicillin - 1000U / ml) L929 cells were exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂; 150 μ M for 2 h of exposure) for genotoxicity induction (positive control) and sterile distilled water (negative control). Cell cultures were also co-treated with increasing concentrations of red

propolis (100, 250, and 500 µg/mL) and H₂O₂ (150 µM) samples for 2 h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere (test group).

The degree of DNA damage was visually identified by analyzing the tail formed by the DNA fragments, with the tail size being proportional to the extent of the damage caused (Mezzalana et al., 2014). One hundred comets per slide were analyzed and classified by visual analysis into five categories (0, 1, 2, 3, and 4), which represent the percentage of DNA in the comet's tail, indicating the degree of injury sustained by the cell (Lovell et al., 1999).

2.5 | Photoprotective activity in vivo

To evaluate the photoprotective activity of red propolis in vivo, thirty 60-day-old male Wistar rats, *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), weighing approximately 200 g each were used. All animals were kept in a vivarium, housed in polypropylene boxes (2 animals per box) with lined wood, under temperature control (21-23°C), 12 hours light and 12 hours dark photoperiods, receiving commercial food (23% crude protein, 4% total lipids, 5% fiber and 12% minerals) and water ad libitum.

The experimental protocol was submitted to the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal Rural University of Semi-Arid (UFERSA), with protocol number 23091.008231/2019-86.

The animals were randomly distributed in three experimental groups with 10 rats each: G1 - the dorsal region of the animal received no topical application of red propolis concentrate extract and was not exposed to UVB irradiation (negative control); G2 - animals were not subjected to topical extract application and were irradiated (positive control); G3 - animals were subjected to topical extract application and were irradiated (test group).

2.6 | Irradiation of rat skin

The animals were anesthetized with xylazine hydrochloride (8.0 mg/kg) and ketamine hydrochloride (140 mg/kg), administered intraperitoneally. After anesthesia, a trichotomy was performed on the dorsolumbar region skin, comprising a square area of 25 mm². One hour before the beginning of the irradiation, on the trichotomized back of the G3 animals, 0.5 g of the red propolis concentrate stratum was topically applied according to the methodology described by Figueiredo et al. (2014). The concentrated extract was applied with the aid of sterile and individual wood spatulas, forming a film of 2.0 mg/cm², which covered the entire surface of the trichotomized skin.

The UVB irradiation model was performed as described by Batista et al. (2018), which used a UVB ultraviolet lamp, model Osram ULTRA-VITALUX, which emits radiation in the range of 315-400 nm. The lamp was located 20 cm above the area to be irradiated. Upon reaching the anesthetic plane, the animals were placed supine on a wooden board and their dorsal regions were directly exposed to UVB radiation for a period of 1 hour.

2.7 | Macroscopic examination

One hour after the end of irradiation, the animals were euthanized by cervical dislocation under deep anesthesia. The dorsal region of each animal was evaluated macroscopically, allowing for the identification of possible alterations, such as blisters, coloration, brightness, opacity of the skin, anything besides softness and hydration. The intensity of these changes was classified as absent (0), discrete (+), moderate (++), and intense (+++).

2.8 | Histological and morphometric examination

The skin area of the dorsal region of each animal was incised with a scalpel blade n° 15, where it was divulsed and separated from the subcutaneous tissue with scissors with the aid of a dissecting forceps. Subsequently, skin fragments were fixed in 10% formaldehyde buffered solution and routinely processed for histology, embedded in paraffin, cut to 5 μm thick, stained with hematoxylin-eosin (HE), by Masson's trichrome for evaluation of collagen fibers, and Toluidine Blue for mast cell evaluation. Descriptive histological analysis of the skin alterations was performed, as well as the quantification of the density of inflammatory cells, mast cells, necrotic cells, and collagen fibers. For this, a total of 20 microscopic fields of each animal's skin were randomly evaluated using an optical microscope, the image of which was captured by a Canon camera and computer scanned using Image Pro-plus Software version 6.0 (Media Cybernetics - LP, USA).

2.9 | Statistical analysis

The results of the density of the histological parameters (inflammatory cells, mast cells, necrotic cells, and collagen fibers) obtained for each group were submitted to statistical analysis using the One-Way ANOVA and Tukey test to assess whether or not significant differences existed between groups. The level of significance was set at 5%; i.e., P values < 0.05 were considered significant.

3 | RESULTS

3.1 | Phenol content, total flavonoids, and antioxidant activity

The ethanolic extract used for the photoprotection test of UVB irradiated Wistar rats showed phenol, flavonoid, and antioxidant activity levels of 141.07 mg, 8.35 mg QE/100 g, and 61.0450 $\mu\text{g/mL}$, respectively (Table 1).

The results obtained in the DPPH free radical sequestration ability test showed that red propolis has the ability to sequester free radicals owing to its low IC_{50} value. Melo et al. (2010) classified the antioxidant activity of an extract as good when this extract has $\text{IC}_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$, moderate when $\text{IC}_{50} < 152 \mu\text{g/mL}$, and low when $\text{IC}_{50} > 152 \mu\text{g/mL}$.

3.2 | Genoprotective effect

In the present study, an in vitro test was performed to evaluate the possible genoprotective effect of the ethanol extract of the red propolis of Rio Grande do Norte against the DNA damage caused by H₂O₂. The results showed that there is a genoprotective effect of the red propolis ethanolic extract, as in the comparison of the averages of L929 cell DNA damage indices, in all tested concentrations of the extract, no significant differences were observed in relation to the negative control (sterile distilled water), as shown in Table 2.

3.3 | In vitro photoprotective potential

The results presented in Table 3 indicate that the ethanolic extract of red propolis has photoprotective activity, as it was possible to verify that in the ultraviolet radiation ranges, between 290 and 320 nm, all the tested concentrations showed relatively high absorbance of ultraviolet radiation, especially at concentrations of 100 mg/L and 50.0 mg/L.

3.4 | In vivo photoprotective potential: macroscopy, histology, and skin morphometry

The macroscopic evaluation of the skin of the dorsum of the animals showed clinical similarity between G1 and G2, without evidence of alterations, with smooth surface, whitish, silky and hydrated coloration (Figure 1). In the histological analysis, it was verified that the skin of the animals belonging to G1 presented a normal histological aspect, with an intact, keratinized epithelium and without evidence of collagen alterations in the subcutaneous tissue. The presence of intraepidermal blisters, subepidermal clefts with focal areas of separation of the epidermis and the dermis, and the presence of necrotic and vacuolated cells were observed in the skin of G2 animals. In the dermis of the animals of this group, it was possible to observe moderate presence of mast cells, vascular congestion and hemorrhage characterized by extravasation of red blood cells in the interstitium; besides interstitial edema. In the papillary and reticular dermis, it was observed rarefaction of the collagen fibers, the collagen fibers present were degraded, fragmented and disorganized. The G3 animals showed an integrated epidermis, with a histological pattern similar to the skin of G1 animals. The presence of mast cells, moderate vascular congestion and interstitial edema were also observed in the dermis of G3 animals (Figure 2).

In the quantification of histological components, it was possible to observe that the mean values of inflammatory cell density were significantly higher in G2 compared to the other groups. Mean values of mast cell density were higher in G2 and there were no significant differences between G1 and G3. Mean values of necrotic cell density were significantly higher in G2 and G3 when compared to G1. Another important histological aspect observed in the G2 animals was the significant reduction in collagen density compared to the other groups; however, collagen density did not differ significantly between G1 and G3 (table 4).

In the quantification of the histological components, it was possible to observe the mean values of the density of inflammatory cells were significantly higher in G2 in relation to the other groups. The mean values of mast cell density were higher in G2 and there were no

significant differences in G1 in relation to G3. The mean values of the necrotic cell density were significantly higher in G2 and G3 than in G1. Another important histological aspect observed in the animals of G2 was the significant reduction of the density of collagen in relation to the other groups. However, the density of collagen did not differ significantly in G1 and G3 (Table 4).

4 | DISCUSSION

4.1 | Phenol content, total flavonoids, and antioxidant activity

According to Cardinault et al. (2012), the levels of phenols and total flavonoids present in a propolis sample are closely related to the floral ecology of each region visited by bees. It is important to mention that other studies with red propolis, such as ones carried out in Alagoas (Frozza et al., 2013), Cuba (Piccinelli et al., 2005) and China (Hatano et al., 2012), also contained significant amounts of phenols and total flavonoids. Araújo et al. (2016) highlighted that many biological functions of propolis can be attributed to its antioxidant and anti-inflammatory components, which are promoted by phenolic compounds. Thus, the finding of high levels of phenols and total flavonoids in this study are indicators of the high quality of red propolis from Rio Grande do Norte.

As antioxidant activity is attributed to the ability to eliminate reactive oxygen/free radical species by hydrogen donation, the DPPH (a stable free radical) reduction test is used to verify the antioxidant activity of propolis extracts of different bees (Ahn et al., 2007). Using this classification method, it was observed that in general, the red propolis used in the present study had good antioxidant activity. In a study by Frozza et al., (2013), red propolis collected in Sergipe showed an IC_{50} of 270 $\mu\text{g/mL}$; so we can attribute, to the red propolis of the current study, high antioxidant activity when compared to the values of the referred authors.

4.2 | Genoprotective effect

The literature often points out that the biological properties of propolis are related to the presence of a variety of biologically active compounds, mainly phenolic compounds, which include flavonoids (Naggar et al., 2016). Phenolic compounds have already been described for having antigenotoxic activity because of their antioxidant activity (Gontijo et al., 2014). Thus, the antioxidant activity of red propolis could be the possible explanation for its genoprotective effect. The bioactive substances with antioxidant capacity present in the analyzed extract sample probably interacted with H_2O_2 , blocking its deleterious effect on DNA, thus exerting genoprotective activity. To our knowledge, there are no studies evaluating the genoprotective effect of red propolis using a comet assay. The finding of a genoprotective effect in the L929 cell line suggests that the red propolis obtained in Rio Grande do Norte may be able to help prevent diseases triggered by DNA damage.

4.3 | In vitro photoprotective potential

According to Nascimento et al. (2014), an ideal organic photoprotector should protect the skin against UVB rays (290-320 nm). Thus, it is evident that the red propolis of Rio Grande do Norte meets the quality requirements required for a good organic photoprotector.

Natural products that absorb in the ultraviolet region have, in their composition, active molecules that act as sunscreen, among which are the flavonoids and polyphenols, which are secondary metabolites that assume a prominent position in terms of spectral absorption by solar radiation in the UVB range. Thus, the presence of phenolic compounds and flavonoids, as demonstrated in the present study, may be related to the observed photoprotective activity of red propolis. Specifically in red propolis, the presence of retusapurpurin A and retusapurpurin B pigments have also been reported (Piccinelli et al., 2011), thus, the large amount of these components present in propolis may have contributed to the absorption of the ultraviolet spectra and high absorbance of red propolis in the present study.

4.4 | Photoprotective potential in vivo: macroscopy, histology, and skin morphometry

The macroscopic histological examination confirmed the deleterious effect of UVB irradiation as well as the photoprotective effect of the concentrated extract of red propolis. In the skin of irradiated animals without topical application of the propolis extract (G2), necrotic cells, vacuolated mast cells, vascular congestion, hemorrhage, interstitial edema and dissociation of collagen fibers were found. In the quantification of the histological components, significantly high densities of inflammatory cells and necrotic cells were observed in the animals with irradiated skin. Conversely, in the animals' skin subjected to the topical application of propolis extract and irradiation (G3), the density mast cell count did not differ from the control group, wherein the skin was not irradiated. Thus, it is evident that the exposure of the skin to UVB radiation triggered an acute inflammatory reaction, which was characterized by the presence of leukocyte cells, hyperemia, and edema. The topical use of concentrated red propolis extract from the present study thus reduced the intensity of the inflammatory reaction promoted by UVB radiation, which plays a relevant role in the etiopathogenesis of acute UVB-induced cutaneous lesions.

Another important finding regarding the quantification of histological elements was the significant reduction of collagen in the skin radiated by UVB rays and the absence of statistical significance in relation to the control group. This fact demonstrates that UVB irradiation was able to affect the deepest layers, such as the reticular dermis, and cause changes to the collagen fibers. It was therefore evident that the concentrated extract of the red propolis was able to prevent the penetration of the radiation in the deep layers of the skin and contribute to preserving collagen and skin tissue.

Much of the demographic surface of Brazil is located between the Tropic of Capricorn and the Equator, thus being a geographical location that receives a high intensity of solar radiation (Cabral et al., 2011). UVA (321-400 nm) is the radiation that penetrates deep into the skin, reaching the dermal layer, and is directly related to skin lesions such as burns,

photoaging, hyperpigmentation, erythema, and a high incidence of skin cancers such as carcinoma and melanoma (Venditti. et al., 2011; Baillo & Lima 2012).

Recent photoprotection strategies have included incorporating natural antioxidant and anti-inflammatory compounds such as flavonoids into sunscreens and oral administration of natural antioxidant extracts (Almeida et al., 2019). As red propolis from Rio Grande do Norte had not yet been evaluated for photoprotective activity in vitro and in vivo, and as sunscreens are made up of a mixture of excipients and vehicles that may interfere with the evaluation of photoprotective potential, we decided to test it in its pure form.

5 | CONCLUSION

The ethanolic extract of red propolis produced by *Apis mellifera* in the semiarid region of Rio Grande do Norte, Brazil, presented in its composition high levels of phenols and total flavonoids, and demonstrated antioxidant capacity. In vitro, red propolis extract promoted a genoprotective effect by reducing DNA damage in H₂O₂-injured L929 cells, and also demonstrated satisfactory absorbance of ultraviolet radiation in the range of 290 to 320 nm. In vivo, the concentrated extract of propolis exerted a photoprotective effect, as shown in the skin of Wistar rats subjected to topical application of propolis and UVB irradiation.

CONFLICTS OF INTEREST:

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

5 REFERENCES

- AHN, M., KUMAZAWA, S., USUI, Y., NAKAMURA, J., MATSUKA, M., ZHU, F., & NAKAYAMA T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, 101(4), 1383-1392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.045>
- ALMEIDA, W. A. S., ANTUNES, A. A., PENIDO, R. G., CORREA, H. S. G., NASCIMENTO, A. M., ANDRADE, A. L., SANTOS, V. M. R. (2019). Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.02.003>
- ARAÚJO, K. S. S., SANTOS JÚNIOR, J. F., SATO, M. O., FINCO, F. D. B. A., SOARES, I. M., BARBOSA, R. S., MARIANO, S. M. B. (2016). Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and *Apis* from two regions of

Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, 46(1), 61-68. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-3304392201501045>

BANKOVA, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, 100(2), 114-117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>

BATISTA, C. M., ALVES, A. V. F., QUEIROZ, L. A., LIMA, B. S., FILHO, R. N. P., ARAÚJO, A. A. S., ... CARDOSO, J. C. (2018). The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, 180, 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.028>

BUENO-SILVA, Bruno et al. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 61, n. 19, p.4546-4550, 3 maio 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf305468f>.

CARDINAULT, N., CAYEUX, M.O., & DU SERT P.P. (2012). La propolis: origine, composition et propriétés. **Phytother**, 10(5), 298-304. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0733-y>

FIGUEIREDO, S. A., VILELA, F. M. P., SILVA, C. A., CUNHA, T. M., SANTOS, M. H., & FONSECA, M. J. V. (2014) In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, 131, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.01.004>

FROZZA, C. O., GARCIA, C. S., GAMBATO, G., SOUZA, M. D., SALVADOR, M., MOURA, S., ... ROESCH-ELY M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, 52, 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>

GARCIA, R. C., SÁ, M. E. P., LANGONI, H., FUNARI, S. R. C. (2004). Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre a *Pasteurella multocida* “in vitro” e em coelhos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, 26(1), 69-77. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v26i1.1952>

GONTIJO, D. C., FIETTO, L. C., & LEITE, J. P. V. (2014). Phytochemical evaluation and antioxidant, antimutagenic and toxicological activity of the aqueous extract of leaves of *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 16(4), 874-880. http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_002

HANZEL, B. E., BORGES, P. C., 7 PAIM, C. S. (2013). 'Green' photoprotectors, a new way to protect your skin and the environment. Nov.

HATANO, A., NONAKA, T., YOSHINO, M., AHN, M.R., TAZAWA, S., ARAKI, Y., & KUMAZAWA S. (2012). Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. **Food Science and Technology Research**, 18(4), 577-584. <https://doi.org/10.3136/fstr.18.577>

- LOVELL, M. A., GABBITA, S. P., & MARKESBERY, W. R. (1999). Increased DNA oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. **Journal of Neurochemistry**, 72(2), 771-776. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720771.x>
- MANSUR, J. S., BREDER, M. N. R., MANSUR, M. C. D., AZULAY, R. D. (1986). Determination of the sun protection factor by spectrophotometry. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 61(3), 376 121-124.
- MELO, M. R., & SIQUEIRA, A. P. N. D. F. (2012). Development of a photoprotective lotion, stability evaluation and in vitro determination of SPF. *Perquirere*, 9(1), 81-97.
- MELO, J.G., ARAÚJO, T.A.S., CASTRO, V.T.N.A., CABRAL, D.L.V., RODRIGUES, M.D., NASCIMENTO, S.C., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE U.P. 2010. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**. 15(12):8534-8542. <https://doi.org/10.3390/molecules15128534>
- MENSOR, L. L., MENEZES, F. S., LEITÃO, G. G., REIS, A. S., SANTOS, T. C., COUBE, C. S., & LEITÃO, S. G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15(2), 127-130. <https://doi.org/10.1002/ptr.687>
- MEZZALIRA, B., FUNCHAL, C., & DANI, C. (2014). Ensaio cometa: avaliação da atividade dos calcogênio. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, 2(33), 47-55. <http://dx.doi.org/10.15602/1983-9480/cmbs.v16n33p47-55>
- NAGGAR, Y. A., SUN, J., ROBERTSON, A., GIESY, J. P., & WISEMAN, S. (2016). Chemical characterization and antioxidant properties of Canadian propolis. **Journal of Apicultural Research & Bee World**, 55(4), 305-314. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1233700>
- NASCIMENTO, L. F., SANTOS, E. P., & AGUIAR, A. P. (2014). Organic Photoprotectors: Research, Innovation and the Importance of Organic Synthesis. **Revista Virtual de Química**, 6 (2), 190-223. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140015>
- PICCINELLI, C.L.; CAMPONE, L.; RUBIO, O.C.; FERNANDEZ, M.C.; ASTRELLI, L. (2011). 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**, v.59, p. 6484-6491. <https://doi.org/10.1021/jf201280z>
- PICCINELLI, A. L., CAMPO, F. M., CUESTA-RUBIO, O., MÁRQUEZ, H. I., DE SIMONE, F., & RASTRELLI, L. (2005). Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9010-9016. <https://doi.org/10.1021/jf0518756>

SALATINO, A., FERNANDES-SILVA, C.C., RIGHI, A. A., & SALATINO, M.L. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, 28(5), 925-936. [https:// doi: 10.1039/c0np00072h](https://doi.org/10.1039/c0np00072h)

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods Enzymology**, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

VENDITTI, E., BRUGÈ, F., ASTOLFI, P., KOCHEVAR, I., & DAMIANI, E. (2011). Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photoprotect UVA-irradiated human skin fibroblast against oxidative damage. **Journal of Dermatological Science**, 63, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.03.008>

Table 1. Hay content, total flavonoids, and antioxidant activity of *Apis mellifera* red propolis obtained from Rio Grande do Norte, Brazil.

Material analyzed	Total phenols (mg GAE 100 g ⁻¹ ± DP)	Total flavonoids (mg QE 100 g ⁻¹ ± DP)	RSA IC ₅₀ (µg ml ⁻¹ ± DP)
Red propolis	141,07 ± 1,27	8,35 ± 0,28	61,04 ± 0,31

GAE: Equal Gallic Acid; IC₅₀: 50% inhibitory concentration; QEAC: Quercetin equivalent antioxidant content; RSA (IC₅₀): radical scavenging activity; SD: Standard Deviation.

Table 2. Mean ± standard deviation of DNA damage indices (IdDNA), analyzed by comet assay to evaluate the genoprotective effect of the red propolis ethanolic extract, after exposure of L929 cells (fibroblasts), in three different concentrations of the extract, hydrogen peroxide (H₂O₂) and sterile distilled water.

Parameter	Concentration (µl ml ⁻¹)			Control +	Control -
IdDNA	500	250	100	135,22±21,52 ^b	8,80±3,92 ^a
	9,17 ± 3,51 ^a	8,22 ± 2,87 ^a	6,21 ± 2,34 ^a		

^{a, b} Mean values followed by different lower-case letters on the line means statistical difference (p < 0.05), and mean values on the same line followed by equal letters are statistically equal. IdDNA: DNA damage index; positive control (+): Hydrogen peroxide (H₂O₂); negative control (-): Distilled water.

Table 3 - In vitro photoprotective activity of the ethanol extract of *Apis mellifera* red propolis obtained in Rio Grande do Norte, Brazil, in different concentrations.

λ / nm	Concentration (mg/L)		
	10.0	50,0	100
290	0,0100	0,340	0,622
295	0,0140	0,354	0,760
300	0,0765	0,287	0,811
305	0,0785	0,401	1,205
310	0,0870	0,402	1,580
315	0,0860	0,534	1,834
320	0,0760	0,498	1,998

Table 4 - Mean values of standard deviation of the density of the histological parameters of the skin of Wistar rats, in the different experimental groups. (G1), unirradiated and untreated skin with concentrated extract of red propolis; (G2) skin submitted to UVB and (G3) irradiation submitted to topical application of the propolis extract and irradiated with UVB.

Histological parameters	Groups		
	G1	G2	G3
Inflammatory cells	282,23 $\pm$ 22,9 ^c	3296,5 $\pm$ 37,3 ^a	956,34 $\pm$ 58,9 ^b
Mast cells	175,23 $\pm$ 26,2 ^b	688,27 $\pm$ 51,7 ^a	224,47 $\pm$ 66,5 ^b
Necrotic cells	2,0 $\pm$ 20,3 ^c	428,25 $\pm$ 36,3 ^a	78,0,47 $\pm$ 25,3 ^b
Collagen fibers	325,24 $\pm$ 98,2 ^a	70,22 $\pm$ 66,5 ^b	298,34 $\pm$ 56,1 ^a

^{a,b,c}Different lowercase letters on the same line means statistical difference ($p < 0,05$).

Legend of figures

Figure 1 - Macroscopic appearance of the skin of *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, Wistar line, in the experimental groups. Non-irradiated and untreated skin with concentrated extract of red propolis (G1), skin submitted to UVB (G2) irradiation and skin submitted to the topical application of the propolis extract and irradiated with UVB (G3). In G1 and G3 there is no change. In G2, it was observed skin with intense hyperemia, presence of bubbles coated thin superficial crust of reddish coloration, moderate opacity, aspects aspect dry, coriaceous, surface rough and rough.

Figure 2 - Skin photomicrographs of Wistar rats stained with hematoxylin and eosin, in the different experimental groups. (G1), unirradiated and untreated skin with concentrated extract of red propolis; (G2) skin subjected to UVB irradiation and (G3), skin submitted to the topical application of the propolis extract and irradiated with UVB. In pictures A and D, skin with normal histological appearance is observed. Image B presents subepidermal clefts, separation of the epidermis with the dermis, in addition to necrotic cells and vacuoles in the dermis. Image C shows vascular coagulation, hemorrhage, interstitial edema and dissociation of collagen fibers. Obj. Scale bar = 200µm.

Figure 1

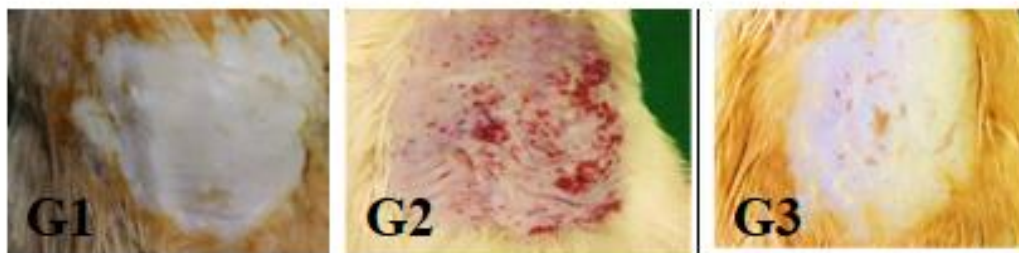
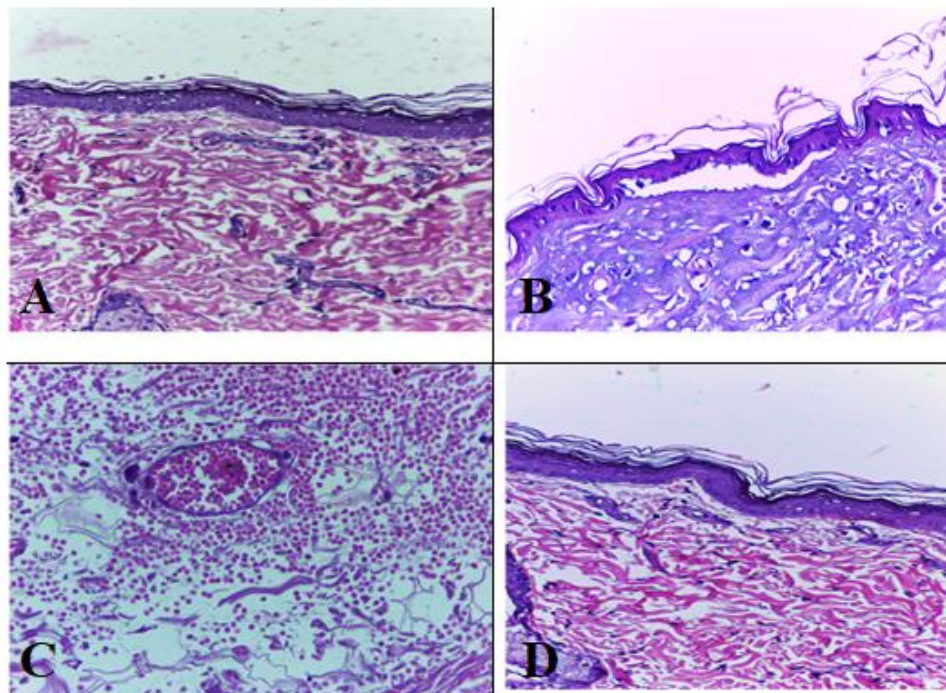


Figure 2



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados expostos foi possível demonstrar que a utilização do extrato etanólico da própolis vermelha produzida por *Apis mellífera* na região semiárida do Rio Grande do Norte, Brasil, apresentou em sua composição altos níveis de fenóis e flavonóides totais e demonstrou capacidade antioxidante. *In vitro*, o extrato de própolis vermelha promoveu um efeito genoprotetor, reduzindo os danos no DNA das células L929 lesionadas com H_2O_2 , e também demonstrou absorvência satisfatória da radiação ultravioleta na faixa de 290 a 320 nm. *In vivo*, o extrato concentrado de própolis exerceu efeito fotoprotetor, como mostrado na pele de ratos Wistar submetidos à aplicação tópica de própolis e irradiação com UVB, na qual não foram observadas lesões macroscópicas ou alterações histológicas significativas.

Esses resultados abrem as portas para trabalhos futuros com a própolis vermelha e suas atividades fotoprotetora e genoprotetora.

ANEXO 1 – Termo de Aceite para utilização de animais



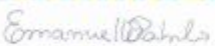
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 20 de novembro de 2019.

PARECER 39/2019

Certificamos que o projeto intitulado "**POTENCIAL GENOPROTETOR E FOTOPROTETOR DA PRÓPOLIS VERMELHA PRODUZIDA POR APIS MELLIFERA NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**" protocolo n. 23091.008231/2019-86 sob a responsabilidade de Jael Soares Batista, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Arido –UFERSA em reunião de 19/11/2019, mediante resposta satisfatória ao memorando CEUA 06/2019.

Vigência do projeto	Dezembro de 2019 a março de 2020
Espécie/linhagem	Rattus novergicus/Wistar
N. de Animais	30
Peso/idade	Adultos
Sexo	Machos
Origem	Biotério da UFC


Emanuelle Fontenele Rabelo

Coordenadora CEUA-UFERSA