



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

GEYSA ALMEIDA VIANA

**EFEITO FOTOPROTETOR, GENOPROTETOR E ANTINEOPLÁSICO DA
APITOXINA DA *Apis mellifera* DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

MOSSORÓ - RN
2019

GEYSA ALMEIDA VIANA

**EFEITO FOTOPROTETOR, GENOPROTETOR E ANTINEOPLÁSICO DA
APITOXINA DA *Apis mellifera* DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista- UFERSA

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas

MOSSORÓ - RN
2019

© Todos os direitos estão reservados a 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 tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

V397e VIANA, GEYSA .
EFEITO FOTOPROTETOR, GENOPROTETOR E
ANTINEOPLÁSICO DA APITOXINA DA *Apis mellifera* DO
SEMIÁRIDO BRASILEIRO. / GEYSA VIANA. - 2019.
85 f. : il.

Orientador: JUEL SOARES BATISTA.
Coorientador: CARLOS IBERÊ ALVES FREITAS.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2019.

1. Veneno abelha. 2. nordeste-Brasil. 3.
citotoxicidade. I. SOARES BATISTA, JUEL, orient.
II. ALVES FREITAS, CARLOS IBERÊ, co-orient. III.
Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

GEYSA ALMEIDA VIANA

**EFEITO FOTOPROTETOR, GENOPROTETOR E ANTINEOPLÁSICO DA
APITOXINA DA *Apis mellifera* DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

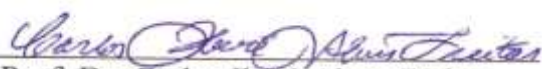
Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Defendida em: **02 de SETEMBRO de 2019.**

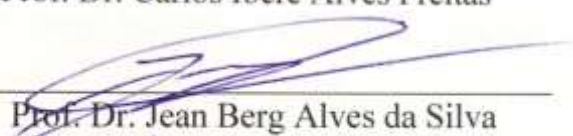
BANCA EXAMINADORA



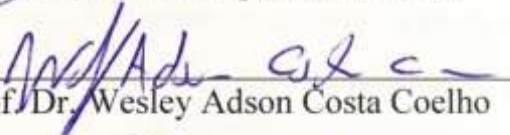
Prof. Dr. Jael Soares Batista



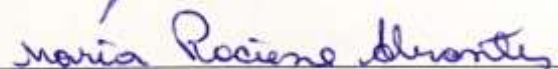
Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva



Prof. Dr. Wesley Adson Costa Coelho



Prof. Dra. Maria Rociene Abrantes

GEYSA ALMEIDA VIANA

**EFEITO FOTOPROTETOR, GENOPROTETOR E ANTINEOPLÁSICO DA
APITOXINA DA *Apis mellifera* DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO.**

EQUIPE ENVOLVIDA

DOUTORANDO: Geysa Almeida Viana

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Sanidade animal

ENDEREÇO: Rua Gal Tertuliano Potiguara 340, ap.102

E.MAIL: geysaalmeidav@hotmail.com

CPF: 845.702.533-34

TELEFONE: (84) 99935-8343

ORIENTADOR: Jael Soares Batista

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Sanidade animal

ENDEREÇO: BR 110 Km 47

E.MAIL: jaelsoares@ufersa.edu.br

CPF: 684.931.933-72

TELEFONE: (84) 8864-5368

COORIENTADOR: Carlos Iberê Alves Freitas

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Sanidade animal

ENDEREÇO: BR 110 Km 47

E.MAIL: iberefreitas@bol.com.br

CPF: 774.420.327-53

TELEFONE: (84) 98868-4445

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GEYSA ALMEIDA VIANA – nasceu no dia 05 de junho de 1980, no município de Fortaleza, estado do Ceará - Brasil. Ingressou no curso de Medicina Veterinária nas Faculdades INTA em fevereiro de 2008, transferindo o curso para a Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) em março de 2010. Durante a graduação participou de projetos de pesquisas relacionadas à área de qualidade do leite de cabra como bolsista de extensão da EMBRAPA Caprinos, sob orientação da Dra Lea Chapaval, e na área de patologia animal na UFERSA, sob a orientação do Prof. Dr. Jael Batista. Por dois anos foi bolsista de Iniciação científica do CNPq, e por seis meses cooperou como monitora, com a disciplina de Patologia Veterinária. Em abril de 2013 concluiu a graduação, tornando-se Médica Veterinária, e em maio de 2013 iniciou o mestrado em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) sob orientação do Prof. Dr. Jael Batista. Durante o mestrado desenvolveu pesquisas relacionadas à avaliação de atividades biológicas da apitoxina da abelha africanizada (*Apis mellifera*); continuando nesse período com suas atividades na rotina do laboratório de Patologia animal da UFERSA. Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, na modalidade Doutorado, pela (UFERSA) em 2016, com a orientação do professor doutor Jael Soares Batista, desenvolveu pesquisas sobre avaliação do potencial fotoprotetor e genoprotetor da apitoxina da *Apis mellifera* do rio grande do norte, brasil.

À Akyra e Aika, minhas filhas peludas que me acompanharam nessa trajetória, nas horas difíceis e nas madrugadas de estudo, desde a graduação. (In Memoriam).

Aos meus pais, Airton e Dalva, aos meus irmãos e sobrinhos, por sempre acreditarem e confiarem em mim, e por todo carinho e apoio nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Jael Soares Batista, por todo tempo de convivência e ensinamentos, por toda compreensão, paciência e por toda a confiança depositada. Tenho a certeza que muito da profissional que me tornei devo a você e a tudo que vivemos nesses 9 anos de orientação e aventuras nessa vida de pesquisa.

Ao prof. Carlos Iberê Alves Freitas, por todas as orientações e ajuda durante todo o mestrado e doutorado.

Ao prof. Djair Message, por todos os contatos, instruções e informações repassadas, e por sempre estar à disposição para nos ajudar.

Ao prof. Jean Berg, pelas orientações, pela compreensão, por toda a ajuda e pela disponibilidade que sempre tem para todos os alunos do programa.

Aos meus pais, José Airton e Dalva Stela, meus irmãos e sobrinhos, que nunca duvidaram do meu potencial, que me deram todo o apoio necessário, sempre respeitando as minhas escolhas sem questionamentos.

Ao meu companheiro Bruno Leonardo, por me acompanhar nessa caminhada dividindo comigo os momentos de dificuldade e me dando força pra superá-los.

Aos meus filhos de pêlos, Argus, Akyra, Aika, Dori Lúcia e Maria Eduarda por me tornarem uma pessoa melhor, dando mais alegria à minha vida, por todo amor incondicional e pela companhia de todos os dias. Eu fui e irei com vocês até o fim.

Às minhas irmãs de coração que conheci em Mossoró, Érica, Maiena e Priscila, pela amizade verdadeira e lealdade, por dividirem comigo sorrisos e lágrimas, e por tornarem os meus dias difíceis mais alegres.

Aos meus tios de coração, Everaldo e Fátima, que por muitos momentos foram meu ponto de apoio e minha família em Mossoró.

À veterinária e amiga Livia Campos, pelo incentivo e amizade, por compartilhar sonhos, planos, dificuldades e vitórias desde a graduação.

À bióloga e amiga Joselena Mendonça, pela ajuda nas coletas, pelos bons momentos compartilhados e pela enorme contribuição para concretização desse sonho.

Ao meu amigo Robério Gomes Olinda, que sempre esteve presente e ajudou em tudo que estava ao seu alcance quando precisei.

Aos colegas de equipe e médicos veterinários Kizzy, Kaliane, Jardel e Gerad, por serem sempre parceiros durante todo tempo de convivência.

E por fim, ao meu pai celestial, o meu Deus do impossível, que me protege, me dá forças, me consola em todos os momentos de dificuldade e me guia sempre para o melhor caminho, sem olhar para trás.

EFEITO FOTOPROTETOR, GENOPROTETOR E ANTINEOPLÁSICO DA APITOXINA DA *Apis mellifera* DO SEMIÁRIDO BRASILEIRO. VIANA, Geysa Almeida. Efeito fotoprotetor, genoprotetor e antineoplásico da apitoxina da *Apis mellifera* do Semiárido brasileiro. 2019. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do SemiÁrido (UFERSA), Mossoró – RN, Brasil, 2019.

RESUMO: Este estudo objetivou avaliar a atividade fotoprotetora *in vivo*, e o potencial genoprotetor e antineoplásico *in vitro* da apitoxina produzida pela *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte. Para tanto, foram avaliadas a atividades antioxidante da solução aquosa de apitoxina através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), bem como a avaliação do seu potencial genotóxico e antigenotóxico através do ensaio cometa. A atividade antineoplásica nas linhagens de células tumorais humanas de adenocarcinoma de pâncreas (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), melanoma (MAD-MB435) e astrocitoma (SNB19) foram verificadas através do método colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol], assim como a atividade citotóxica em células normais de fibroblastos (L929) e queratinócitos (HACAT). O efeito fotoprotetor *in vivo* do gel com apitoxina foi avaliado em 16 ratos Wistar, sendo distribuídos em quatro grupos experimentais com 4 ratos em cada: Grupo 1 (G1) composto por ratos no qual a pele da região dorsal não recebeu aplicação tópica do gel a base de apitoxina e não foi submetido à irradiação UVB; Grupo 2 (G2) cuja a pele dos animais não foram submetidos a aplicação tópica do gel e foram irradiados; Grupo 3 (G3) cuja a pele foi submetidos a aplicação tópica do gel a base de apitoxina a 2.5% e submetido à irradiação e o Grupo 4 (G4), no qual a pele foi submetidos a aplicação tópica do gel a base de apitoxina a 5.0% e submetido à irradiação. Na atividade antioxidante, os resultados mostraram que a capacidade inibitória da solução de apitoxina (IC₅₀) foi de 0.648 mg/mL. Os maiores percentuais de inibição do DPPH foram obtidos nas concentrações de 1mg/mL e 0.8mg/mL, que foram respectivamente de 74.92% e 60.85%. A apitoxina não exerceu efeito genotóxico em células da linhagem L929 nas concentrações de 30 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL após 24 horas de exposição, sendo apenas evidenciado esse efeito na concentração de 50 µg/mL. Também, em todas as concentrações testadas, a apitoxina promoveu redução significativa do índice de dano ao DNA (idDNA) quando comparado ao controle positivo (células tratadas com H₂O₂). O potencial antineoplásico foi demonstrado *in vitro*, uma vez que nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL foram observados efeito citotóxico, com redução significativa dos percentuais de viabilidade das linhagens tumorais PC3, HEPG2, MAD-MB435 e SNB19, porém não apresentou citotoxicidade em células normais L929 e HACAT, sugerindo uma ação seletiva. Foi evidenciado que o gel a base de apitoxina foi capaz de proteger a pele da irradiação UVB, uma vez que a pele dos animais dos G3 e G4 apresentaram padrão morfológico macroscópico e histológico semelhante ao G1, enquanto que na pele dos ratos do G2 foram observados no exame macroscópico áreas focais de queimadura e eritema, e no exame histológico necrose de queratinócitos, presença de células inflamatórias, mastócitos, congestão vascular, edema intersticial e dissociação das fibras colágenas. A alta atividade antioxidante evidenciada, associada à ausência de efeito genotóxico, genoprotetor e citotóxico em células normais, fornecem indícios das potencialidades terapêuticas da apitoxina, e confirmam seu efeito antineoplásico nas linhagens tumorais PC3, HEPG2, MAD-MB435 e SNB19, além disso, justificam o seu uso em formulações cosméticas fotoprotetoras.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Veneno abelha, nordeste-Brasil, citotoxicidade, fotoproteção.

PHOTOPROTECTIVE, GENOPROTECTIVE AND ANTINEOPLASIC EFFECT OF APITOXIN FROM THE *Apis mellifera* OF BRAZILIAN SEMIARID. **VIANA, Geysa Almeida.** Photoprotective, genoprotective and antineoplastic effect of apitoxin from *Apis mellifera* of Brazilian semiarid. 2019.85 f. **Thesis (Doctorate in Animal Science) - Graduate Program in Animal Science, Federal Rural Semi-Arid University (UFERSA), Mossoró - RN, Brazil, 2019.**

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the photoprotective activity *in vivo*, and the *in vitro* genoprotective and antineoplastic potential of apitoxin produced by *Apis mellifera* in the semiarid of Rio Grande do Norte. For this, the antioxidant activities of the aqueous solution of apitoxin were evaluated by the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl), as well as the *in vitro* evaluation of its genotoxic and antigenotoxic potential through the comet assay. *In vitro* antineoplastic activity in human tumor cell lines: poststrate adenocarcinoma (PC3), hepatocellular carcinoma (HEPG2), melanoma (MAD-MB435) and astrocytoma (SNB19) were verified by the MTT [3- (4 bromide) colorimetric method-5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium], as well as cytotoxic activity in normal fibroblast (L929) and keratinocyte (HACAT) cells. The *in vivo* photoprotective effect of apitoxin gel was evaluated in 16 Wistar rats and was divided into four experimental groups with 4 rats in each: Group 1 (G1) composed of rats in which the skin of the dorsal region did not receive topical gel application apitoxin base and was not subjected to UVB irradiation; Group 2 (G2) whose animals' skin was not subjected to topical gel application and were irradiated; Group 3 (G3) whose skin was subjected to topical application of 2.5% apitoxin-based gel and irradiated and Group 4 (G4), where the skin was subjected to topical application of apitoxin-based gel to 5.0% and subjected to irradiation. In antioxidant activity, the results show that the inhibitory capacity of apitoxin solution (IC₅₀) was 0.648 mg / mL. The highest percentages of DPPH inhibition were obtained at concentrations of 1mg / mL and 0.8mg / mL, which were respectively 74.92% and 60.85%. Apitoxin had no genotoxic effect on L929 cells at concentrations of 30 µg / mL, 10 µg / mL and 5 µg / mL after 24 hours of exposure. This effect was only evidenced at 50 µg / mL. Also, at all concentrations tested, apitoxin promoted a significant reduction in DNA damage index (idDNA) when compared to the positive control (cells treated with H₂O₂). The antineoplastic potential was demonstrated *in vitro*, since at concentrations of 50 µg / mL and 25 µg / mL cytotoxic effect was observed, with significant reduction of viability percentages of PC3, HEPG2, MAD-MB435 and SNB19 tumors, but not presented cytotoxicity in normal L929 and HACAT cells, suggesting a selective action. It was evidenced that the apitoxin-based gel was able to protect the skin from UVB irradiation, since the skin of G3 and G4 animals showed similar macroscopic and histological morphological pattern to G1, whereas in the skin of G2 rats were observed on macroscopic examination focal areas of burn and erythema, and on histological examination keratinocyte necrosis, presence of inflammatory cells, mast cells, vascular congestion, interstitial edema and collagen fiber dissociation. The high antioxidant activity evidenced, associated with the absence of genotoxic, genoprotective and cytotoxic effects in normal cells, provide evidence of the therapeutic potential of apitoxin, and confirm its antineoplastic effect on PC3, HEPG2, MAD-MB435 and SNB19 tumor lines, its use in photoprotective cosmetic formulations.

INDEX TERMS: Bee venom, northeastern Brazil, cytotoxicity, photoprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Imagem do aparelho produtor e excretor de veneno	24
Figura 2	– Saco do veneno de abelha <i>A. nigrocincta</i> observado por microscopia 3D hirox KH-8700].....	24

CAPÍTULO II

Figura 1	– Coleta das amostras de apitoxina de <i>A. melífera</i> obtidas no semiárido do Rio grande do Norte.....	50
Figura 2	– Amostra de apitoxina de <i>A. melífera</i> obtida na região do semiárido norterio-grandense	50
Figura 3	– Esquema demonstrativo da placa de 96 poços utilizada nos ensaios de citotoxicidade para avaliar a viabilidade celular pelo método MTT.....	54
Figura 4	– Solução metanólica indicando o consumo do DPPH, inicialmente de coloração violeta tornando-se amarela	55
Figura 5	– Equação da reta, em função da concentração da solução de apitoxina com suas respectivas absorbâncias.....	56

CAPÍTULO III

Figura 1	– Equação da reta, em função da concentração da solução de apitoxina com suas respectivas absorbâncias.....	76
Figura 2	– Efeito da apitoxina na viabilidade das células tumorais normais L929 (Fibroblastos murino) e HACAT (Queratinócitos), sob diferentes concentrações($\mu\text{g/mL}$), após 72 horas de incubação.....	77
Figura 3	– Aspecto macroscópico da pele de <i>Rattus norvegicus</i> Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, nos grupos experimentais. Pele não tratada com gel fotoprotetor e não submetida à irradiação UVB (G1), pele submetida à irradiação UVB e não tratada com gel fotoprotetor (G2), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 2,5% e à irradiação UVB (G3), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 5% e à irradiação UVB (G4)	79
Figura 4	– Fotomicrografias da pele de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina, nos diferentes grupos experimentais. Pele não irradiada e não tratada com gel com apitoxina (G1), pele submetida à irradiação UVB e não tratada com gel fotoprotetor (G2), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 2,5% e à irradiação UVB (G3), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 5% e à irradiação UVB (G4). Obj. 20x. Barra de escala = 200 μm	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Linhagem, tipo histológico e origem das células tumorais utilizadas na avaliação da atividade antineoplásica.....	51
Tabela 2	–	Média $\pm$ desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotóxico da apitoxina, após exposição de fibroblastos da linhagem L929, por 24 em três concentrações da solução aquosa de apitoxina, ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) e a água destilada estéril.....	58
Tabela 3	–	Média $\pm$ desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor da apitoxina em fibroblastos da linhagem L929, co-tratadas com três concentrações da solução aquosa de apitoxina.....	58
Tabela 4	–	Efeito citotóxico da apitoxina produzida pela abelha <i>Apis mellifera</i> no semiárido do Rio Grande do Norte, analisado pela técnica de MTT sobre linhagens tumorais humanas adenocarcinoma de próstata (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), astrocitoma (SNB19), melanoma (MAD-MB435), e célula não neoplásica fibroblasto (L929). As células foram tratadas com diferentes concentrações da solução de apitoxina por 72 horas. Os resultados estão expressos por porcentagem média $\pm$ desvio padrão de viabilidade de células.....	61
Tabela 5	–	Médias e desvios-padrão obtidos para os valores da concentração inibitória (IC ₅₀) da apitoxina produzida pela abelha <i>Apis mellifera</i> no semiárido do Rio Grande do Norte, frente às linhagens neoplásicas humana adenocarcinoma de próstata (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), astrocitoma (SNB19) e melanoma (MAD-MB435).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celcius
µL	Microlitro
µg	Micrograma
AA	Atividade antioxidante
ANOVA	ANALISYS OF Variance (Análise de Variância)
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	1,1-difenil- 2-picrilidrazil
GAE. g ⁻¹	Equivalente em ácido gálico
HACAT	Queratinócitos Murino
HEPG2	Carcinoma Hepatocelular Humana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
L929	Fibroblasto Murino
µg	Micrograma
µmol	Micromol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MDA-MB435	Melanoma Humano
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5difenil-brometo de tetrazolium
NCI	National Cancer Institute
nm	Nanômetro
PC3	Adenocarcinoma de Próstata Humana
RN	Rio Grande do Norte

rpm	Rotações por minuto
SNB19	Astrocitoma Camundongo
UFC	Universidade Federal do Ceará
UERN	Universidade Estadual do Rio Grande do Norte
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagens
<	Menor que
±	Mais ou menos
®	Registrada

SUMÁRIO

	PÁGINA
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 APITERAPIA.....	19
3.2 <i>Apis mellifera</i>	21
3.3 APITOXINA.....	24
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	27
3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
3.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	30
3.7 GENOPROTEÇÃO.....	32
3.8 FOTOPROTEÇÃO.....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	35
4 OBJETIVOS.....	36
4.1 OBJETIVO GERAL.....	36
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
 6. CAPÍTULO I - ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, GENOTÓXICA, ANTIGENOTÓXICA E ANTINEOPLÁSICAS DA APITOXINA PRODUZIDA POR <i>Apis mellifera</i> NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.....	 45
 7. CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E FOTOPROTETOR DA APITOXINA DA <i>Apis mellifera</i> DO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.....	 67
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Em todo mundo, recursos que possuam moléculas bioativas com potencial atividade terapêutica tem sido alvo de intensas investigações, sendo esses recursos buscados em toda a biodiversidade, onde nesse contexto a caatinga tem se destacado bem entre os biomas do nordeste brasileiro (BASTOS *et al.*, 2011). Os produtos oriundos da colmeia têm oferecido importantes contribuições para a civilização humana e para economia, e dentre os produtos apícolas o veneno da abelha (apitoxina) tem apresentado propriedades curativas (LEITE e ROCHA, 2005).

A apicultura trata-se da criação de abelhas, sendo considerada uma atividade sustentável que pode ser desenvolvida por pequenos produtores, com retorno financeiro significativo e baixo impacto ambiental, conservando espécies vegetais nativas e possibilitando a utilização permanente de recursos naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Por ser um produto de alto valor biológico que apresenta muitas propriedades terapêuticas e um alto valor agregado (ORSOLIC, 2011; MOREIRA, 2012; ZHOU *et al.*, 2010), a produção da apitoxina demonstra ser economicamente viável, tornando cada vez mais atrativa sua extração no campo.

Das abelhas utilizadas na apicultura, as do gênero *Apis*, como a *Apis mellifera*, popularmente conhecidas como abelha africanizada ou abelha do mel, são as mais comuns (MOREIRA, 2012). Park *et al.* (2014a,b) também afirmam que a abelha européia é uma espécie cosmopolita e amplamente utilizada na apicultura em todo o mundo.

A apitoxina produzida é o veneno utilizado por elas para proteger a colônia contra a extensa variedade de predadores (RATCLIFFE *et al.*, 2007; ORSOLIC, 2011). Os indivíduos da espécie *A. mellifera* produzem o veneno por meio de duas glândulas localizadas no interior do abdômen da abelha operária, uma de secreção ácida e outra de secreção alcalina (KOKOT *et al.*, 2011; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010).

O veneno da abelha é um líquido incolor (BAQER & YASEEN, 2018), sendo uma mistura complexa que possui vários peptídeos, enzimas, amins biologicamente ativas e componentes não peptídicos, como histamina, dopamina e norepinefrina (SON *et al.*, 2007). Sua composição consiste de 88 % água, e os 12% restantes contém componentes (LEANDRO, *et al.*, 2015), podendo essa composição variar em função da idade, da sazonalidade e entre regiões geográficas (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; SCIANI *et al.*, 2010). Dentre os componentes os que mais se destacam são a melitina e a fosfolipase A₂, que representam

juntas cerca de 75% do seu peso seco (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010).

A terapia com a apitoxina para o tratamento de doenças tem sido usada na medicina tradicional oriental desde 1000 e 3000 ac (KWON *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2018). Seu potencial terapêutico é significativo no tratamento de doenças neurodegenerativas (YANG *et al.*, 2011; YOON *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2012; CHUNG *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2011a,b; DOO *et al.*, 2010; CAI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, o veneno também tem sido utilizado na indústria de cosméticos como auxiliar no retardo do envelhecimento (HAN *et al.*, 2012).

Em estudos já foi demonstrado que a melitina apresenta diversas atividades terapêuticas, como hemolítica (ORSOLIC, 2011; ZHOU *et al.*, 2010), analgésica (ZHOU *et al.*, 2010) anti-inflamatória (ORSOLIC, 2011; YANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010), antibacteriana e antifúngica (ORSOLIC, 2011; YANG *et al.*, 2011), antinociceptiva (KIM *et al.*, 2003), hepatoprotetora (PARK *et al.*, 2010) antiviral e antineoplásica (ORSOLIC, 2011; YANG *et al.*, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010).

Considerando que o Brasil tem sua localização geográfica que recebe a maior intensidade de radiações solares (CABRAL *et al.*, 2011), é importante enfatizar que a fração UVA (321-400) é a radiação que penetra profundamente na pele, atingindo a camada dérmica a qual está diretamente relacionada a lesões cutâneas e a alta incidência de câncer de pele, tais como carcinoma e melanoma (BAILLO e LIMA 2012). Na epiderme e derme, os raios UVB promovem reações fotoquímicas e interações secundárias que geram radicais livres capazes de promover estresse oxidativo e consequentemente danos ao DNA, proteínas e membrana celular (ARIMON *et al.* 2015, ROMANHOLE *et al.*, 2016).

Diante disso, nas últimas décadas, os compostos derivados de fontes naturais, ganharam atenção considerável para uso em produtos de proteção solar, uma vez que a utilização de cosméticos naturais é uma tendência do mercado internacional. Isso aumenta a importância de se estudar uma ampla seleção de moléculas ativas em formulações de filtros solares (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).

Estratégias recentes de fotoproteção, incluíram a incorporação de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios naturais em protetores solares (ALMEIDA *et al.*, 2019). Tendo em vista a importância de se pesquisar o efeito fotoprotetor da apitoxina da *Apis melífera* do semiárido do Rio Grande do Norte como moléculas ativas em formulações de filtros solares, desenvolveu-se este estudo buscando avaliar seu potencial antioxidante, citotóxico e genoprotetor que estariam associados à fotoproteção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 APITERAPIA

Muitos modelos de medicina alternativa que não são considerados como válidos pela medicina convencional, apresentam resultados positivos em terapias, como a acupuntura, fitoterapia, quiropraxia, apiterapia, homeopatia, aromoterapia, etc. A apiterapia como medicina alternativa vem demonstrar uma nova forma de tratamento para a cura de diversas patologias (MOREIRA, *et al*, 2012).

A apiterapia é definida como o emprego de produtos apícolas para finalidades terapêuticas, que remonta a antiguidade, com aplicabilidade descrita desde Hipócrates (460-370 a.C.), Aristóteles (384-332 a.C.) e Galeno (130-200 d.C.) (HELNNER *et al.*, 2007). Ela pode envolver o uso da própria abelha na acupuntura ou de produtos de origem apícola (ZHU e WONGSIRI, 2008). Esses produtos oriundos da colmeia, como o mel, a própolis e demais produtos provenientes das abelhas, foram largamente utilizados por civilizações egípcias, gregas, romanas e incas em prol da saúde humana (RATCLIFFE *et al.*, 2011).

A importante atividade antibacteriana do mel de abelhas deve ser destacada, cujo mecanismo de ação tem alcançando estirpes resistentes aos antibióticos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginos*. Adicionalmente, resultados positivos têm sido obtidos frente a processos de cicatrização e também mediante quadros de rinite alérgica após administração de mel ou da geléia real (RATCLIFFE *et al.*, 2011). A própolis, resina produzida pelas abelhas a partir de brotos, ramos e botões florais de diversas partes das plantas, apresenta suas propriedades biológicas ratificadas constantemente pela literatura e suas atividades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral, dentre outras, são amplamente exploradas (CABRAL *et al.*, 2009).

Dentre os produtos apícolas oriundos da colmeia, que têm oferecido importantes contribuições para a civilização humana e para economia, o veneno da abelha tem apresentado várias propriedades curativas (SCHALKA, 2014), sendo a terapia com seu uso utilizada na medicina tradicional oriental desde 1000 e 3000 ac (ZHANG *et al*, 2018), principalmente para o tratamento da artrite, reumatismo e outras doenças auto-imunes, bem como contra o câncer, doenças de pele, dor e infecções (RATCLIFFE *et al.*, 2011; CHEN; LARIVIERE, 2010, KIM *et al.*, 2013). Segundo Chen e Lariviere (2010), a composição da apitoxina desperta o interesse da comunidade científica desde o século XIX, e na década de 80 já estimava-se a importância deste possível agente terapêutico na medicina ocidental.

Na Europa e em alguns mercados globais existem algumas fórmulas farmacêuticas registradas para ser utilizado em terapias com o veneno de abelha bruto (MATYSIAK *et al.*, 2011), e atualmente existem várias técnicas para aplicação deste método, porém as mais utilizadas são em pomadas ou gel, que tornam a toxina menos ativa. Aplicação sublingual, subcutânea com agulhas, injeções ou picadas também são outras formas utilizadas na terapêutica (MOREIRA, *et al*, 2012, ALI, 2012).

Os compostos presentes na apitoxina e em outras toxinas produzidas por animais venenosos podem ser aproveitados no desenvolvimento de uma ampla gama de fármacos, e no cenário atual, a utilização do veneno de abelhas têm se mostrado uma proposta diferenciada de produto a ser extraído da apicultura e com grande visibilidade no mercado externo (MATYSIAK *et al.*, 2011). Esses compostos oferecem excelentes fontes com altas concentrações de enzimas ativas, citocinas e neurotoxinas, que servem como ferramentas para estudo do funcionamento subcelular dos sistemas nervoso e cardiovascular dos mamíferos (MITCHELL, 2006).

Este fato tem sido reconhecido por várias empresas, em virtude da grande exploração de produtos naturais provenientes de insetos, utilizando modernas técnicas de análises bioquímica e molecular (RATCLIFFE *et al.*, 2011; MITCHELL, 2006). Son *et al.* (2007), afirmaram que empresas farmacêuticas estão atualmente financiando extensa investigação sobre o potencial do veneno como a próxima geração de drogas no combate ao câncer.

Um importante exemplo é a pesquisa realizada por Lee *et al.* (2010a), onde o tratamento com veneno de abelhas apresentou resultados favoráveis inclusive diante de condições ateroscleróticas. Administrado via intraperitoneal, a toxina reduziu a formação de placas ateroscleróticas e o nível de lipídios séricos em camundongos. O tratamento com a apitoxina diminuiu também o colesterol total e o teor de triglicérides, enquanto aumentava a lipoproteína de alta densidade (HDL-C) nos animais com aterosclerose experimental.

Outro estudo realizado por Oršolić (2011), apresentou resultados altamente relevantes sobre o assunto, foi onde o autor evidenciou que a apitoxina apresenta resultados positivos quando utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, entre eles os cânceres de bexiga, fígado, mama, próstata, pulmão e rim. Segundo a pesquisa, a destruição das células cancerígenas ocorre principalmente pela ação dos componentes melitina, fosfolipase A₂ e apamina, elementos que agem contra as células tumorais.

Deste modo, as vastas propriedades biológicas da apitoxina, e de seus principais componentes, fazem deste, um importante produto apícola com largo potencial de aplicabilidade terapêutica. Sendo assim, devido ao reconhecimento de suas propriedades

terapêuticas no meio científico, a apitoxina configura-se como um recurso altamente relevante a ser continuamente explorado a favor da saúde humana.

2.2 *Apis mellifera*

A Abelha é um inseto que pertence à ordem dos himenópteros e à família dos apídeos, sendo insetos sociais que vivem em colônias. São conhecidas cerca de vinte mil espécies diferentes e, são as abelhas do gênero *Apis mellifera* que mais se prestam para a polinização, ajudando a agricultura, produção de mel, geléia real, cera, própolis e pólen (RAMOS e CARVALHO, 2007).

Os aspectos anatômicos desta espécie consistem em um exoesqueleto, que fornece proteção para os órgãos internos, sustentação para os músculos e proteção contra a perda de água; e estrutura corpórea dividida em cabeça, tórax e abdome (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002). A cabeça é a estrutura mais sensível do corpo, com os olhos, as antenas, o aparelho bucal, as glândulas (internamente), duas antenas que possuem estruturas sensoriais para tato, audição e olfato (SANDOZ, 2011) e o aparelho bucal, composto por duas mandíbulas e a língua ou glossa (EMBRAPA, 2002).

No tórax destacam-se os três pares de pernas e dois pares de asas de estrutura membranosa, grande quantidade de pêlos, que possuem importante função na fixação dos grãos de pólen quando as abelhas entram em contato com as flores (EMBRAPA, 2002), além dos espiráculos (órgãos de respiração), esôfago (MEYER; WIESE, 1985) e glândulas salivares envolvidas no processamento do alimento. No abdome encontram-se órgãos do aparelho digestivo, circulatório, reprodutor, excretor, órgãos de defesa e glândulas produtoras de cera (NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2002), além do ferrão, no final do abdome, onde mediante situações de perigo identificadas pelo inseto ele excreta o veneno (HERNÁNDEZ, 2003).

Inseto trabalhador, disciplinado, a abelha convive num sistema de extraordinária organização: em cada colméia existem cerca de 60 mil abelhas e cada colônia é constituída por uma única rainha, dezenas de zangões e milhares de operárias. As abelhas podem ser consideradas de acordo com seus hábitos, ou outras conveniências, em três categorias: sociais, solitárias e parasitas (CICCO, 2007).

A composição social de um enxame se resume em três indivíduos: a rainha, a operária e o zangão. Só a rainha é uma fêmea normal reprodutora, com seus ovários desenvolvidos. As operárias são fêmeas estéreis e somam o maior número da população de um enxame, sendo responsáveis pelo equilíbrio do conjunto. O zangão é o macho. É o único indivíduo que não

trabalha e tem acesso livre em qualquer colmeia. O comportamento da *Apis mellifera* é resultante das interações entre o seu potencial genético, seu estado fisiológico, as condições da colmeia e do meio ambiente onde se encontra (TRINDADE *et al.*, 2004).

Nas abelhas africanizadas as características das abelhas africanas predominam, tais como a grande capacidade de enxamear e a rusticidade. Muito agressivas, porém, menos que as africanas, a abelha do Brasil tem grande facilidade de enxamear, alta produtividade, relativamente tolerantes à pragas e doenças e adapta-se a climas mais frios, continuando o trabalho em temperaturas baixas, enquanto as européias se recolhem nessas épocas (KERR, 1967; PEREIRA, 2003). A alta capacidade de defesa, de adaptação e a capacidade de reprodução com ciclo de vida mais curto que as demais subespécies aqui existentes, também são características das africanizadas (GONÇALVES, 1994).

Em relação ao comportamento de coleta de alimento da espécie, a coleta de pólen e néctar é realizada pelas operárias, e se dá em função da necessidade alimentar de carboidratos e proteína, para o desenvolvimento populacional da colmeia. O néctar, matéria prima para a produção do mel, é responsável pela energia propulsora do desenvolvimento populacional do enxame, e o pólen, é o grande responsável pelo desenvolvimento da glândula hipofaríngea que secreta a geléia real, a qual serve de alimento para todas as larvas, no início do desenvolvimento (MARCHINI e MORETI, 2003).

Para a sua sobrevivência é necessário que as abelhas utilizem formas de defesa através do seu comportamento para a proteção da colônia, como é o caso da liberação do veneno no ato de ferroar. Portanto, a apitoxina produzida é o veneno utilizado por elas para proteger a colônia contra a extensa variedade de predadores (RATCLIFFE *et al.*, 2007; ORSOLIC, 2011). Os indivíduos da espécie *A. mellifera* produzem o veneno por meio de duas glândulas localizadas no interior do abdômen da abelha operária, uma de secreção ácida e outra de secreção alcalina (KOKOT *et al.*, 2011; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010). O comportamento da *Apis mellifera* é resultante das interações entre o seu potencial genético, seu estado fisiológico, as condições da colmeia e do meio ambiente onde se encontra (COUTO, 1989).

Um estudo comparativo realizado entre a produção e a liberação do veneno durante a ferroada por abelhas africanizadas e híbridas europeias, constataram que as africanizadas liberam maior quantidade de veneno, mesmo apresentando um menor volume no reservatório (FUNARI *et al.*, 2004). O veneno, desde a sua produção até a liberação, abrange um percurso que compreende o sistema glandular, o saco de veneno, o bulbo do ferrão com sua respectiva organização muscular e o ferrão (HERNÁNDEZ, 2003) (Figura 1).

A glândula responsável pela produção do veneno em *A. melífera* passa apenas por um ciclo secretor durante a vida das operárias adultas, este que se inicia no final do estágio de pupa. Como em outras glândulas exócrinas, o ciclo de desenvolvimento das glândulas de veneno da inclui uma etapa ativo seguida por uma etapa de regressão (ABREU *et al*, 2010.)

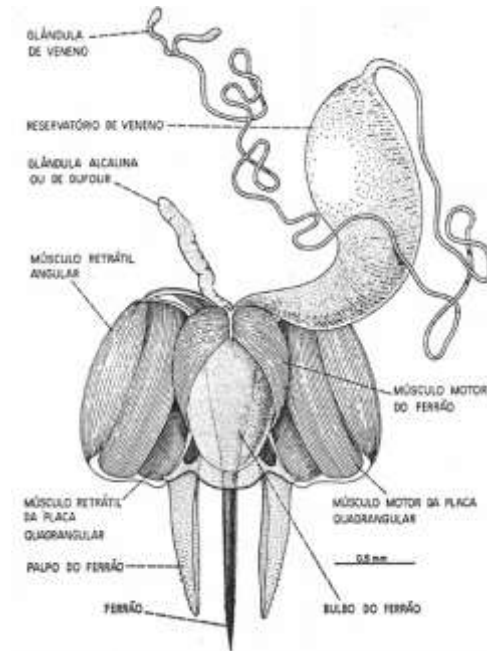


Figura 1. Imagem do aparelho produtor e excretor de veneno.
Fonte: CAMARGO, 1970.

No momento da ferroadada, o ferrão da abelha se encaixa mediante contração muscular e liberam o veneno, de maneira que ao ser usado contra animais com tecido cutâneo elástico permanece encravado no tecido mole da vítima (OGAWA; KAWAKAMI; YAMAGUCHI, 2011). Quando a abelha tenta retirá-lo, o ferrão e o sétimo seguimento abdominal são cortados e deixados *in situ*, devido a elasticidade do tecido corpóreo da vítima e a fragilidade da musculatura abdominal que prende o aparelho de ferrão das abelhas, culminando na morte do animal por exaustão ou pela perda contínua da hemolinfa. Assim, o último gânglio nervoso e os músculos que operam o saco do veneno são deixados com o ferrão (Figura 2), de modo que ele continua a injetar o veneno no corpo da vítima (CHEN; LARIVIERE, 2010).

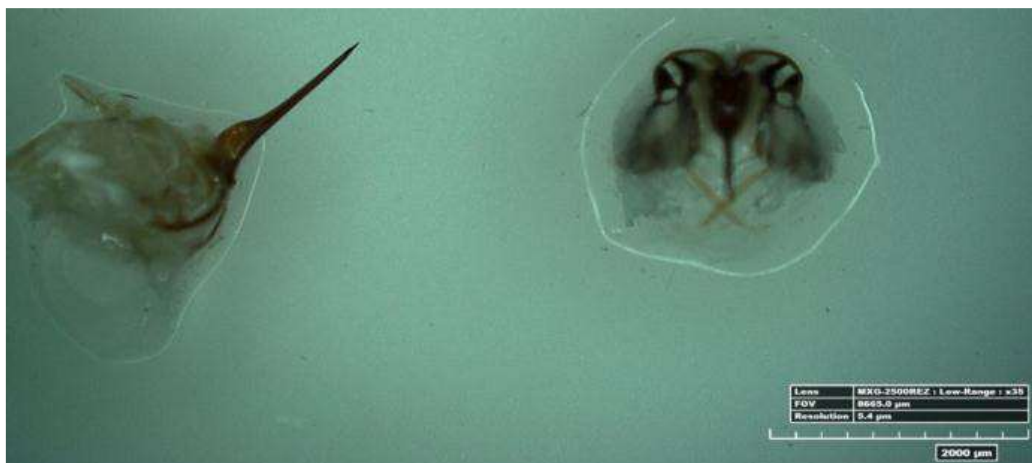


Figura 2. Saco do veneno de abelha *A. nigrocincta* observado por microscopia 3D hirox KH-8700]. Fonte: MOKOSULI *et al.*, 2013.

2.3 APITOXINA

A palavra apitoxina vem do latim e significa: *apis* - abelha e *toxikon* – veneno. Ela é o veneno produzido pelas abelhas, e talvez seja o mais intrigante dentre todos os produtos apícolas (ZHOU *et al.*, 2010). É produzido pelas abelhas com objetivo de proteger a colônia contra a extensa variedade de predadores, que vão desde outros artrópodes a vertebrados (ORŠOLIĆ, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010). Na espécie *A. mellifera*, é secretado por glândulas e armazenado no reservatório de veneno (ZHOU *et al.*, 2010), onde a glândula de veneno consiste em um filamento secretor unido na sua porção proximal com o reservatório, que se abre para o ferrão (LELLO, 1971). A secreção no lúmen glandular e no reservatório é alcalina (CRUZ - LANDIM *et al.*, 1967), mas torna-se ácida após secreção (LELLO, 1968).

Em estudos já realizados, as análises bioquímicas mostraram que durante a fase ativa, a glândula de veneno de *A. mellifera* segrega uma mistura de, pelo menos, 50 componentes identificados, a maioria dos quais têm um efeito tóxico sobre várias espécies de insetos e invertebrados (PONTES e OWEN, 1984). Esta substância consiste em uma mistura complexa de enzimas (KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988), peptídeos (MATYSIAK *et al.*, 2011; KOKOT *et al.*, 2011; SCIANI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988) e aminoácidos (ZHOU *et al.*, 2010; HIDER, 1988), além de pequenas quantidades de carboidratos e lipídios (HIDER, 1988). Adicionalmente, já foi observado que a composição da apitoxina pode variar em função da sazonalidade e entre regiões geográficas (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; SCIANI *et al.*, 2010).

Em testes com ratos, este composto aumentou a memória a curto prazo. A hialuronidase, enzima que despolimeriza ácido hialurônico, facilita a entrada de substâncias curativas e a eliminação de substâncias tóxicas em uma área danificada. A dopamina é um neurotransmissor que aumenta a atividade motora. É deficiente nos pacientes de Parkinson e excessivo em pacientes psicopatas tratados com drogas neurolépticas (BECK, 1997). A apamina bloqueia os canais de $\text{Ca}^{+2} + \text{K}$ durante a transmissão sináptica nos nervos e a adolapina é neurotransmissor que tem efeito analgésico (SOKOL *et al.*, 1994).

De acordo com a literatura, a melitina presente na apitoxina, apresenta intensa atividade hemolítica (ORŠOLIĆ, 2011; ZHOU *et al.*, 2010), efeito analgésico significativo (ZHOU *et al.*, 2010) e importante ação antiinflamatória (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010), antibacteriana e antifúngica (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011), e apresenta ainda ação antiviral e antitumoral (ORŠOLIĆ, 2011; YANG *et al.*, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010).

Além da melitina, dentre os componentes da apitoxina destaca-se também a fosfolipase A_2 , onde as duas constituem os principais componentes do veneno, representando juntas cerca de 75% do seu peso seco (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010). A fosfolipase A_2 , enzima de natureza glicoprotéica que catalisa a hidrólise de fosfolipídios presentes nas membranas plasmáticas celulares e desencadeia fenômenos bioquímicos em cascata, que convergem para o aparecimento de reações inflamatórias. É um dos principais componentes imunogênicos do veneno de *Apis mellifera* e pode contribuir para a toxicidade generalizada no envenenamento, por uma interação com a melitina (ORŠOLIĆ, 2011).

Quando a fosfolipase A_2 e a Melitina agem juntas seus efeitos são potencializados, fazendo com que a lise celular ocorra mesmo na presença de baixas concentrações desses componentes. A Melitina e Fosfolipase A_2 são ambas tóxicas e agem de forma sinérgica sobre os fosfolipídios das membranas, resultando no comprometimento de sua integridade e da membrana mitocondrial, comprometendo a fosforilação oxidativa e a cadeia respiratória, ocasionando dano tecidual. Essa atividade é exercida sobre diversos grupos celulares como hemácias, células musculares, hepatócitos, fibroblastos, mastócitos e leucócitos (LIMA *et al.*, 2003).

A hialuronidase faz com que o ácido hialurônico fique mais fluido, facilitando a difusão dos componentes do veneno através dos espaços intercelulares dos tecidos, sendo conhecido como "fator propagador" (CARDOSO *et al.*, 2003). A Apamina está presente em apenas 2% da matéria seca. Age no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), bloqueando a transmissão de impulsos inibitórios. A injeção de apamina em ratos mostrou que esta afeta

especificamente as estruturas motoras e auditivas (VÉLEZ, 2010). O peptídeo degranulador de mastócitos (PDM) é o principal responsável pela liberação dos mediadores de mastócitos e basófilos, como a histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico e fatores que atuam sobre plaquetas e eosinófilos. Desempenha papel no quadro de intoxicação histamínica observada nas fases iniciais da ferroada (CARDOSO *et al.*, 2003)

Testes imunológicos detectaram a presença de uma quantidade moderada de histamina e mioglobina no veneno de *A. mellifera*, mas ainda não se sabe precisamente a função dessas substâncias (LIPPS e KHAN, 2001). A histamina parece provocar dor local, edema e hiperemia. Lima *et al.* (2000) observaram a ação proteolítica da protease do veneno de *A. mellifera* e sugeriram que a enzima atua no processo de maturação ou na atividade de outros componentes encontrados no veneno (ARÊDES, 2000).

A introdução da apitoxina nos tecidos celulares desencadeia uma série de reações biológicas na membrana, que variam de acordo com a diversidade bioquímica de seus constituintes. Elementos como fosfolipase A₂, melitina, hialorunidase, apamina e peptídeo degranulador de mastócitos (MCD) interagem com a membrana celular ocasionando importantes reações locais e sistêmicas no organismo atingido (ORŠOLIĆ, 2011;).

A extração da apitoxina pode ser realizada por meio da estimulação manual. Esta técnica, que culmina na morte do animal, consiste numa leve pressão no abdome da abelha que favorecerá a expulsão do veneno pelo ferrão, sendo este veneno líquido coletado por meio de uma microcápsula (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; HIDER, 1988). Contudo, comumente é realizada a extração elétrica.

Segundo Gramacho, Malaspina e Palma (1992), a técnica de coleta por extração elétrica tem sido utilizada desde meados de 1950 e consiste na colocação de um coletor, composto por placas de vidro e gerador de pulsos, conectado a bateria ou a outra fonte de energia, no alvado da colmeia. Quando as abelhas pousam sobre a placa, recebem um choque e reagem no intuito de ferroar a placa coletora elétrica, depositando uma carga de veneno entre o vidro e o material protetor do equipamento, local onde seca e depois é raspado e vendido para a indústria farmacêutica ou laboratório especializado, por exemplo, para ser utilizado em favor da saúde humana (ZHOU *et al.*, 2010; HIDER, 1988).

A principal vantagem desta forma de obtenção da apitoxina, é que não provoca a morte do animal e ainda preserva o ferrão da abelha (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010). Adicionalmente, estima-se que, independente do método de coleta, em uma ferroada a abelha libera 1µg do veneno seco (HIDER, 1988).

2.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A apitoxina é uma das mais importantes substâncias que são produzidas por abelhas. A principal composição do veneno da abelha inteira são polipéptidos e enzimas de baixo peso molecular. Peptídeos como a degranulação de mastócitos (MCD) peptídeo, apamina, adolapina e melitina. Enzimas, tais como hialuronidase, fosfolipase A₂ (PLA₂), α -D-glicosidase, lisofosfolipase, α -acetilamino-deosiglicosidase, arilamidase e esterase do ido fosfomonoesterase (SON *et al.*, 2007).

O veneno da abelha é um líquido incolor (BAQER e YASEEN, 2018), sendo uma mistura complexa que possui vários peptídeos, enzimas, amins biologicamente ativas e componentes não peptídicos, como histamina, dopamina e norepinefrina, que têm diferentes ações farmacêuticas que já foram descritas (SON *et al.*, 2007). Sua composição consiste de 88 % água, e os 12% restantes contém componentes (LEANDRO *et al.*, 2015), podendo essa composição variar em função da idade, da sazonalidade e entre regiões geográficas (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; SCIANI *et al.*, 2010).

A melitina, proteína presente no veneno, é uma substância de elevada ação anti-inflamatória, ocasiona dor e coceira, tem poderoso efeito bactericida (ANDREU *et al.*, 1992) e propriedades citotóxicas (DOLTCHINKOVA *et al.*, 2003). O pH da melitina é altamente básico (YANG *et al.*, 2011), e ela constitui um tipo de peptídeo hidrossolúvel, que consiste de 26 aminoácidos com 6 cargas positivas (ORŠOLIĆ, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010). Os quatro resíduos de aminoácidos com cargas positivas e 6 resíduos de aminoácidos com hidrofília são localizados no fim carboxi-terminal, enquanto os 2 resíduos de aminoácidos com cargas positivas e 20 resíduos de aminoácidos com hidrofobia são situados no fim aminoterminal (ZHOU *et al.*, 2010).

A fosfolipase A₂, enzima de natureza glicoprotéica que catalisa a hidrólise de fosfolipídios presentes nas membranas plasmáticas celulares e desencadeia fenômenos bioquímicos em cascata, que convergem para o aparecimento de reações inflamatórias. É um dos principais componentes imunogênicos do veneno de *Apis mellifera* e pode contribuir para a toxicidade generalizada no envenenamento, por uma interação com a melitina (ORŠOLIĆ, 2011).

As fosfolipases A₂ são enzimas dependentes de Ca²⁺ e liberam ácidos graxos e lisofosfolipídeos. Seu mecanismo de ação está relacionado à destruição de fosfolípidos levando à ruptura da membrana, com consequente formação de "poros", lise celular e assim, permitindo a entrada do veneno nas células. Além do seu papel fundamental no metabolismo de lipídeos,

estas enzimas estão intimamente relacionadas com a liberação de ácido araquidônico, um precursor de lipídeos bioativos, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que podem participar de uma variedade de funções biológicas, como regulação do sono, resposta imune, inflamação e percepção da dor (DE MARIA *et al.*, 2007).

A apamina, menor neurotoxina do veneno de abelha, equivale a 1 a 3% do peso seco do veneno (HIDER, 1988), e consiste em um peptídeo alcalino, polar, de 18 aminoácidos que contém 4 cisteínas com duas ligações dissulfeto (Cis1-Cis1 e Cis3-Cis15) (SPOERRI *et al.*, 1975; FREEMAN *et al.*, 1986). Compõem também a apitoxina: histamina, hialuronidase, catecolaminas (inclusive a dopamina) e serotonina (HERNÁNDEZ, 2003; ORŠOLIĆ, 2011).

A difusão dos componentes do veneno através dos espaços intercelulares dos tecidos ocorre por ação da hialuronidase, que faz com que o ácido hialurônico fique mais fluido, facilitando a, sendo conhecido como "fator propagador" (CARDOSO *et al.*, 2003). Já a apamina presente em apenas 2% da matéria seca do veneno, tem ação no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), bloqueando a transmissão de impulsos inibitórios. A injeção de apamina em ratos mostrou que esta afeta especificamente as estruturas motoras e auditivas (VÉLEZ, 2010).

O peptídeo degranulador de mastócitos (PDM) é o principal responsável pela liberação dos mediadores de mastócitos e basófilos, como a histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico e fatores que atuam sobre plaquetas e eosinófilos. Desempenha papel no quadro de intoxicação histamínica observada nas fases iniciais da ferroadada (CARDOSO *et al.*, 2003)

A histamina parece provocar dor local, edema e hiperemia. Lima *et al.* (2000) observaram a ação proteolítica da protease do veneno de *A. mellifera* e sugeriram que a enzima atua no processo de maturação ou na atividade de outros componentes encontrados no veneno (ARÊDES, 2000).

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A transferência de elétrons é um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células. O efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar dano oxidativo. Radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas (BAE, 1999).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células, e oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo, que se não controlados podem provocar danos extensivos (ROESLER, *et al.*,

2007). Estas moléculas de radicais livres, geradas *in vivo*, reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras. O processo oxidativo que ocorre mais frequentemente no organismo humano é autoxidação dos ácidos graxos insaturados, componente da membrana celular (MELO *et al.*, 2006).

Atualmente sabe-se que os antioxidantes têm grande importância na luta contra os radicais livres, que podem danificar moléculas biológicas com diferentes mecanismos de ação (YOUNG e WOODSIDE, 2001). Já foi comprovado em estudos que as plantas produzem uma grande variedade de substâncias antioxidantes contra os danos moleculares causados por espécies reativas de oxigênio, sendo os compostos fenólicos o principal grupo de compostos antioxidantes de origem vegetal. Entre os fenóis, os flavonóides constituem o grupo mais importante (GOUVÊA, 2004).

O organismo humano possui substâncias antioxidantes endógenas, (ex. Se-glutationa peroxidase, catalase, e superóxido dismutase), porém quando essas não são capazes de conter a produção excessiva dessas espécies reativas de oxigênio, o uso de antioxidantes exógenos através da dieta se faz necessário (PIETTA, 2000). Os antioxidantes naturais são bem indicados para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo celular (GOUVÊA, 2004).

Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fólico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis. Antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários que agem como terminais para os radicais livres (ROESLER, *et al*, 2007).

Em função da grande diversidade química existente, particularmente, entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras. Alguns deles determinam a habilidade dos antioxidantes para sequestrar radicais livres gerados no meio da reação, outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica por meio da quantificação dos produtos da reação, como dienos conjugados e hidroperóxidos, bem como dos produtos de decomposição da peroxidação lipídica ou medindo a inibição da oxidação do lipídio do sistema pelo antioxidante a ser testado (MELO *et al.*, 2006).

A fim de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, dos muitos ensaios que podem ser utilizados, o radical DPPH é muito usado para se avaliar a capacidade sequestradora de produtos apícolas, sendo ele um cromóforo extremamente estável que apresenta uma banda de absorção no comprimento de onda de 515 nm em meio alcoólico e possui uma coloração

violeta intensa. Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron torna-se emparelhado e a absorvidade desaparece. No sistema β -caroteno/ácido linoleico a atividade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico, representada pela oxidação do β -caroteno, é determinada por meio da atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (CABRAL *et al.*, 2006).

É importante salientar ainda que a atividade antioxidante é influenciada pelo substrato lipídico utilizado no ensaio, o solvente e a técnica de extração empregados (FRANKEL, 1993; MADSEN e BERTELSEN, 1995). No que concerne aos solventes orgânicos, o metanol, por conseguir extrair elevada quantidade de compostos bioativos, tem sido apontado como o mais efetivo (ECONOMOU *et al.*, 1991).

Hoje em dia, o interesse no uso de antioxidantes nos alimentos, farmacêuticos e nas indústrias cosméticas estão em constante crescimento. No entanto, as preocupações com a segurança e a toxicidade antioxidantes sintéticos ainda não foram superados (POKORNÝ, 2007; ITO *et al.*, 1986). Portanto, a necessidade de novos e fontes antioxidantes mais seguras ainda são mantidas.

2.6 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Estudos *in vitro* a respeito da indução e progressão da transformação celular induzida por carcinógenos químicos podem propiciar importantes esclarecimentos a respeito dos mecanismos envolvidos neste processo e serem de utilidade para o desenvolvimento de estratégias quimiopreventivas ou quimioterapêuticas para o uso humano. Além disso, a compreensão dos eventos celulares que acompanham a progressão de transformação até o fenótipo neoplásico resultante, oferece a possibilidade de intervenção e prevenção seletivas durante os múltiplos estágios da transformação celular (ZHU; GOODERHAM, 2002).

Com o aprimoramento da cultura de células foi possível, no final da década de 80, o desenvolvimento de linhagens celulares oriundas de tumores humanos, que possibilitaram o desenvolvimento da metodologia para triagem *in vitro* (NCI, 2012). Sendo assim, o crescente controle e o maior rigor para usar animais de laboratórios, faz necessário o desenvolvimento e a padronização de teste *in vitro* que possam apontar a toxicidade de substâncias que futuramente possam ser utilizadas em seres humanos e animais, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo (FROZZA, 2013).

Os testes de citotoxicidade realizados *in vitro*, são parte do *screening* inicial para determinar o possível potencial antitumoral de um produto natural (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Muitos estudos tem relatado que alguns produtos naturais inibem o crescimento de células tumorais e metástases, induzindo apoptose e sugerindo uma crescente aplicação destes compostos naturais como um tratamento de medicina alternativa de tumores humanos (YUSUF *et al.*, 2007).

O potencial citotóxico de um produto natural ou sintético é analisado através de ensaios quantitativos pelo método colorimétrico do MTT, que segundo Mosmann (1983), é um dos testes mais utilizados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação da atividade antineoplásica na rotina de triagem de drogas anticâncer.

O ensaio de MTT é um teste que analisa a viabilidade ou proliferação celular através do dano celular, uma vez que a enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias das células vivas reduz o sal MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio]}, de coloração amarela, a um produto chamado formazana, de coloração azul/violeta. Dessa maneira a quantidade de formazan medida por espectrofotometria é diretamente proporcional ao número de células viáveis (PORTO *et al.*, 2011).

Como parâmetro de atividade antitumoral, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer, considera como compostos ativos com atividade antineoplásica, os compostos que apresentarem $CI_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (ITHARAT *et al.*, 2004). Ainda segundo o referido Instituto, compostos que apresente tais valores de IC_{50} merecem ser submetidos a análises de citotoxicidade mais detalhadas.

Alguns estudos já demonstraram resultados satisfatórios quanto ao potencial antitumoral da apitoxina. Liu et al. (2002), demonstraram que *in vivo* o veneno da abelha inibiu a proliferação de células de melanoma da linhagem B16 e promoveu a morte das células neoplásicas por induzir a apoptose e a fragmentação de DNA, sendo esses fatores considerados pelos referidos autores como os possíveis mecanismos através dos quais o veneno de abelha inibe o crescimento do tumor.

Oršolić (2012) sugere que o mecanismo fundamental do efeito citotóxico do veneno da abelha ocorre através da ativação da fosfolipase A2 pela melitina. Miran *et al.* (2012) descobriram que o veneno de abelha e seu principal componente, a melitina, inibiu o crescimento celular de células epiteliais de câncer de ovário humano (SKOV3 e PA-1), também através da indução de morte celular por apoptose, em uma dose dependente da concentração, com um valor de IC_{50} de 1,5 e 3,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ em células SKOV3 e 1,2 e 2,6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ em células PA-1, respectivamente. Além disso, vários estudos demonstraram que o veneno de abelha e /

ou melitina têm efeitos anti-câncer, incluindo próstata (PARK *et al.*, 2010b), fígado (LIU *et al.*, 2008), mama, células cancerosas renais (PARK *et al.*, 2010a).

A replicação e a transcrição são processos celulares essenciais o qual o DNA tem participação, um dano que desestabiliza este ácido nucleico pode gerar interferências nestas fases da divisão celular, como também levar à morte celular e a indução de mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento. Torna-se importante avaliar possíveis eventos que levam à instabilidade genômica bem como àqueles ligados à manutenção da estabilidade do genoma (HOEIJMAKERS, 2009).

2.7 GENOPROTEÇÃO

A genotoxicidade ou toxicologia genética é uma especialidade que estuda e identifica a ação de qualquer agente que produz efeitos tóxicos e genotóxicos, sobre o material genético (AQUINO, 2010). Baseado nesse contexto, é importante evidenciar que obter novas estruturas químicas menos tóxicas e identificar um produto que contenha potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica, se faz necessário nos estágios iniciais da pesquisa a realização de estudos de genotoxicidade, sendo esta uma ótima alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos (NIWA *et al.*, 2013).

Considerando que o dano ao DNA pode interferir em processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição, além de poder levar à morte celular e induzir mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento, torna-se importante avaliar possíveis eventos que levam à instabilidade genômica bem como àqueles ligados à manutenção da estabilidade do genoma (HOEIJMAKERS, 2009). Testes de mutagenotoxicidade mensuram danos no DNA, que vem a ser um fator relevante no inicial do desenvolvimento de células neoplásicas. Os testes de toxicidade genética e carcinogênese, são utilizados com frequência para uma varredura do espectro toxicológico de substâncias químicas e medicamentos, e também para a descoberta de genoprotetores para o uso cotidiano da prevenção de mutações ao DNA (NIWA *et al.*, 2013).

É possível detectar danos no DNA celular utilizando-se do ensaio cometa, método o qual utiliza o material genético da célula, realizando fragmentação com o uso de substâncias químicas ou radiação, e a seguir é submetido a uma eletroforese, dessa forma, ocorre a migração do DNA fragmentado sobre o gel de agarose e extremidades quebradas da molécula de DNA, de carga negativa, tornando-se livres para migrar no campo eléctrico em sentido ao ânodo,

formando assim uma estrutura que se assemelha a um cometa. O comprimento e a quantidade de DNA na cauda do cometa refletem o dano ao material genético (FIKROVÁ, 2011).

Toda e qualquer substância que atuar na prevenção ou redução da mutagenicidade de um agente mutagênico recebe o título de agente antimutagênico. No entanto, o modo de ação preventivo desta substância pode ocorrer de duas maneiras: pela inativação do mutágeno, antes do seu ataque ao DNA, ou pela inibição da fixação de uma mutação no DNA de um organismo. Desta forma, estes autores sugerem as denominações agentes “desmutagênicos” (inativam a substância) e “bio- antimutagênicos” (inibem fixação da mutação) (KADA e SHIMOI, 1987).

2.8 FOTOPROTEÇÃO

Os compostos derivados de fontes naturais, ganharam atenção considerável nas últimas décadas para uso em produtos de proteção solar, uma vez que a utilização de cosméticos naturais é uma tendência do mercado internacional. Isso aumenta a importância de haver uma ampla seleção de moléculas ativas em formulações de filtros solares (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015). Diante disso, estratégias recentes de fotoproteção incluíram a incorporação de compostos antioxidantes e antiinflamatórios naturais, como flavonóides, em protetores solares e a administração oral de extratos antioxidantes naturais (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Entre as propriedades farmacológicas estudadas em produtos naturais está a ação fotoprotetora. A fotoproteção começou a ser, extremamente, valorizada, não somente para a prevenção das queimaduras solares, mas em virtude dos seus efeitos preventivos contra os efeitos nocivos da radiação UVA e UVB deletérias às células, estruturas celulares e o desenvolvimento de cânceres de pele (BISSONETTE, 2008; RIGEL, 2008; RÜNGER & KAPPES, 2008).

As pesquisas por novos protetores solares vêm ganhando importância na indústria farmacêutica em decorrência dos malefícios causados pela exposição excessiva aos raios ultravioletas (UV), que causam inúmeras alterações cutâneas, como ressecamento, formação de rugas, envelhecimento precoce, imunossupressão, alterações químicas e histológicas, danos ao DNA, podendo evoluir para câncer de pele (GILABERTE e GONZÁLEZ, 2010; LEITE *et al.*, 2015; MEDINA; LOUCHARD; GONÇALVES, 2015).

Os produtos naturais podem atuar como excelentes fotoprotetores, por sequestrar os radicais livres, gerados por cromóforos epidermais lesionados pela radiação UV e exercer assim efeitos inibitórios em diversos eventos celulares, bem como moleculares, induzidos pela

radiação UV capazes de lesionar a pele (AFAQ, 2011). Adicionalmente, os produtos naturais quando utilizados em formulações tópicas, podem proporcionar efeitos benéficos complementares, protegendo a pele através da absorção, reflexão ou dispersão da radiação ultravioleta (MELO e SIQUEIRA, 2012).

Por outro lado, a adição de uma porção apropriada de filtros naturais aos filtros sintéticos, pode contribuir para diminuir a concentração de substâncias sintéticas que possam causar efeitos indesejados no uso das formulações antissolares, além de favorecer a produção de melanina e exercer ações emoliente e umectante (GONZALEZ *et al.*, 2008).

A atividade biológica de um protetor solar é avaliada por sua habilidade em proteger a pele de eritemas e edemas, reduzir o risco de queimaduras e o risco de carcinoma de células da camada basal e espinhosa (TOYOSHIMA *et al.*, 2004), sendo portanto capazes de absorver, refletir ou refratar a radiação ultravioleta e assim proteger a pele da exposição direta da luz solar (GIOKAS *et al.*, 2005). Diante disso, vários extratos e óleos de plantas têm sido utilizados em produtos cosméticos como filtros solares, devido à ação fotoprotetora.

Embora pesquisas avaliando o uso da apitoxina como fotoprotetor ainda não tenham sido consolidadas, estudos realizados por Karapetsas *et al.* (2019), com dez amostras de própolis, coletadas em diferentes regiões da Grécia, durante a primavera e outono, demonstraram que o extrato da própolis grega, possui forte atividade antioxidante, antimutagênico e propriedades antienvhecimento, e também exerceu proteção aos queratinócitos dos efeitos deletérios da radiação UVB.

3. JUSTIFICATIVA

Como grande parte da superfície demográfica do Brasil está entre o trópico de Capricórnio e o Equador, sua localização geográfica recebe uma maior intensidade de radiações solares (CABRAL *et al.*, 2011). É importante considerar que a fração UVA (321-400) é a radiação que está diretamente relacionada a lesões cutâneas, como queimaduras, fotoenvelhecimento, hiperpigmentação, eritemas e a alta incidência de câncer de pele tais como carcinoma e melanoma (BAILLO e LIMA, 2012).

Os raios UVB promovem reações fotoquímicas e interações secundárias que geram radicais livres capazes de promover estresse oxidativo e consequentemente danos ao DNA, proteínas e membrana celular (ARIMON *et al.* 2015, ROMANHOLE *et al.*, 2016). Sendo assim, os estudos sobre genotoxicidade representam um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos, a fim de se identificar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (NIWA *et al.*, 2013).

Compostos derivados de fontes naturais ganharam atenção considerável para uso em produtos de proteção solar e reforçaram a tendência do mercado em direção a cosméticos naturais. Isso aumenta a importância de haver uma ampla seleção de moléculas ativas em formulações de filtros solares (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015). Portanto, estratégias recentes de fotoproteção, incluíram a incorporação de compostos antioxidantes e antiinflamatórios naturais, em protetores solares (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Diante do exposto, este estudo contribuirá com o desenvolvimento de mais um produto natural ainda não estudado quanto à sua ação antissolar, já que a fotoproteção começou a ser, extremamente valorizada, reforçando a tendência do mercado em direção a cosméticos naturais, quanto a prevenção das queimaduras solares e efeitos preventivos contra os efeitos nocivos da radiação UVA e UVB (RIGEL, 2008; RÜNGER e KAPPES, 2008).

Além disso, por ser a apitoxina um produto com alto valor agregado, possibilitando a utilização permanente de recursos naturais, contibui para fortalecer e incentivar a apicultura como atividade econômica na região do semiárido do Rio Grande do Norte, tornando-se mais uma alternativa para aumentar a renda dos pequenos produtores rurais e agricultores familiares.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar o potencial fotoprotetor, genoprotetor e antineoplásico da apitoxina produzida pela abelha *Apis mellífera* do semiárido do Rio Grande do Norte.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante da solução de apitoxina.
- Avaliar o potencial antineoplásico frente às linhagens tumorais PC3, HEPG2, MDA-MB435, SBN19 e L929.
- Avaliar o potencial genoprotetor da solução de apitoxina em linhagem de fibroblastos (L929).
- Avaliar a citotoxicidade da apitoxina em culturas de células de fibroblastos (L929) e queratinócitos (HACAT).
- Desenvolver de um gel fotoprotetor contendo apitoxina e avaliá-lo quanto ao Fator de Proteção Solar (FPS).
- Avaliar *in vivo* a eficácia fotoprotetora da formulação com a apitoxina através da avaliação macroscópica e histológica da pele de ratos Wistar submetidos à irradiação UVB.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, R. M. M.; MORAES, R. L. M. S.; MATHIAS, M. I. C. Biochemical and cytochemical studies of the enzymatic activity of the venom glands of workers of honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, *Apidae*). **Micron**, v. 41, n. 2, p. 172-175, 2010.
- AFAQ, F. Natural agentes: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 508, n. 2, p. 144-151, 2011.
- ALI, M.A. Studies on bee venom and its medical uses. **Int. J. Adv. Res. Technol**, 2012.
- ALMEIDA, W. A. S., ANTUNES, A. A., PENIDO, R. G., CORREA, H. S. G., NASCIMENTO, A. M., ANDRADE, A. L., ... SANTOS, V. M. R. Photoprotective activity and increase of SPF in sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2019.
- AQUINO, I. **Efeito genotóxico da artemisinina e do artesunato em células de mamíferos**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Geral e Aplicada, Departamento de Biomoléculas, Universidade Estadual Paulista "julio Mesquita Filho", Botucatu – Sp, 2010.
- ARIMON, M., TAKEDA, D., POST., K. L., SVIRSKY., HYMAN, B. T., BEREZOVSKA, O. Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology. *Neurobiology of Disease*. v. 84, p. 109-119, 2015.
- BAE, G. U.; SEO, D. W.; KWON, H. K.; LEE, H. Y.; HONG, S.; LEE, Z. W.; HA, K. S.; LEE, H. W.; HAN, J. W.; *J. Biol. Chem.* v.274, 1999.
- BAILLO, V. P., LIMA, A. C. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 93, n.3, p. 271-278, 2012. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2. ed. 120 p. Brasília (DF): Anvisa; 2008.
- BAQER, L.K. & YASEEN, R.T. The Effect of Whole Honey Bee Venom (*Apismellifera*) on Reducing Skin Infection of Rabbits Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: An In vivo Study. **J Pure Appl Microbiol**, v.12, n.4, p.2111-2116, 2018.
- BASTOS, E. M. A. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.
- BECK, B.F. The bible of bee venom therapy: bee venom, its nature, and its effect on arthritic and rheumatoid conditions. **Health Resources Press**, 260 p., 1997.
- BISSONETTE, R. Update on Sunscreens. **Skin Therapy Letter** v.13, n.1, p.5-7, 2008.
- CABRAL, L. D. S., PEREIRA, S. O. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. **Revista Científica do ITPAC**, v.4, n.3, Pub.4, 2011.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CARDOSO, J. L. C.; et al. **Animais Peconhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo, Ed. Sarvier/Fapesp, 2003.

CARVALHO, L. A. C. e MACHINI, M. T. Hemocidinas derivadas da hemoglobina: Estruturas, propriedades e perspectivas. **Quim Nova**, v. 7, p. 1021-1029, 2013.

CAI, M., CHOI, S.M., YANG, E.J. The effects of bee venom acupuncture on the central nervous system and muscle in an animal hsod1g93a mutant. **Toxins** (Basel), v.7, n.3, 2015.

CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 151-183, 2010.

CHUNG, E. S.; KIM, H.; LEE, G.; PARK, S.; KIM, H.; BAE H. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 8, p. 1322-1330, 2012.

COUTO, Regina Helena Nogueira. Polinização com abelhas africanizadas. **Apicultura & Polinização**, v.34, n. 6,p. 32-33, 1989.

DONG, J.S.; LEE, J.W.; YOUNG, H.; LEE, H.S.S.; CHONG, K.; LEE J. T. H. Therapeutic application of anti-arthritis, painreleasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacol Ther.**; v.115, n.2, p.246-70, 2007.

DOO, A. R.; KIM, S.T.; KIM, S. N.; MOON, W.; YIN, C. S.; CHAE, Y.; PARK, H. K.; LEE, H.; PARK, H. J. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridineinduced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, v. 32, p. 88-91, 2010.

ECONOMOU, K. D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 68, n. 2, p.109-113, 1991.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistemas de produção - Produção de mel**. Teresina, v. 3, p. 1-136, 2002.

FERREIRA-JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. de O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon**, v.56, n. 3, p. 355-362, 2010.

FIKROVÁ, P.; STĚTINA, R.; HRONEK, M.; HYŠPLER, R.; TICHÁ, A.; ZADÁK, Z. Application of the comet assay method in clinical studies. **Wiener klinische Wochenschrift**, Áustria, v. 123, n. 23-24, p. 693-699, 2011.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. ANÁLISE DE PRÓPOLIS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GILABERTE, Y.A.B.; GONZÁLEZ, S. C.D. Novedades en fotoprotección. **Dermosifiliogr**, v.101, n.8, p.659-672, 2010.

GONÇALVES, Á.L.M.; LEMOS, M. ; NIERO, R. ; DE ANDRADE, S. F. ; MAISTRO, E. L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 740-745, 2012.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y.; The latest on skin protection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-626, 2008.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Food Sci. Technol.**, v. 4, p. 220-225, 1993.

FROZZA C.O., GARCIA C.S., GAMBATO G., SOUZA M.D., SALVADOR M., MOURA S., PADILHA F.F., SEIXAS F.K., COLLARES T., BORSUK S., DELLAGOSTIN O.A., HENRIQUES J.A. & ROESCH-ELY M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food. Chem. Toxicol.* V.52, p.137-142, 2013.

HAN, S, M.; LEE, G.G; PARK, K. K. Acute Dermal Toxicity Study of Bee Venom (*Apis mellifera* L.) in Rats. **Toxicol Res.**, v. 28, p. 99-102, 2012.

HERNÁNDEZ, R. V. Aspectos toxinológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. **Iatreia**, v. 16, n. 3, p. 217-227, 2003.

HOEIJMAKERS, J.H. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* v.361, n.15, p.1475-1485, 2009.

HOEIJMAKERS J.H. DNA damage, aging, and cancer. **N. Engl. J. Med.** v.361, n.15, p.1475-1485, 2009..

ITHARAT, A., HOUGHTON, P. J., ENO-AMOOQUAYE, E., BURKE, P. J., SAMPSON, J. H., RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p. 33-38, 2004.

ITO, N., HIROSE, M., FUKUSHIMA, S., TSUDA, H., SHIRAI, T., & TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, v.24, p. 1071-1082, 1986.

JEONG, et al. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.68, 2014.

JO, et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.258, 2012.

KADA, T.; SHIMOI, K. Desmutagens and bio-antimutagens - theirs modes of action. **Bioassays**. v 7, n 3, p. 113-6, 1987.

KERR W.K., CARVALHO G.A., NASCIMENTO V.A. Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação. **Fundação Acangauá**, Belo Horizonte, p.1-157, 1997.

KIM, H. W.; KWON, Y. B.; HAM, T. W.; ROH, D. H.; YOON, S. Y.; LEE, H. J.; HAN, H. J.; YANG, I. S.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. **The Journal of veterinary medical science**, v. 65, n. 3, p. 349-355, 2003.

KIM, J. I.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; HUH, Y.; CHO, I. H.; KANG, S.; KOH, H. K. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **The International Journal of Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 209-217, 2011a.

KIM, S. N.; DOO, A. R.; PARK, J. Y.; BAE, H.; CHAE, Y.; SHIM, I.; LEE, H.; MOON, W.; LEE, H.; PARK, H. J. Acupuncture enhances the synaptic dopamine availability to improve motor function in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27566, 2011b.

KIM, S.H.; JUNG, S.Y.; LEE, K.W., LEE, S.H; CAI, M.; CHOI, S.M. and YANG, E.J. Bee venom effects on ubiquitin proteasome system in hSOD1G85R-expressing NSC34 motor neuron cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p.179–186, 2013.

KOKOT, Z. J.; MATYSIAK, J.; URBANIAK, B.; DEREZIŃSKI, P. New CZE-DAD method for honeybee venom analysis and standardization of the product. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 7, p. 2487-2494, 2011.

KWON, Y.B.; LEE, J.D.; LEE, H.J.; HAN, H.J.; MAR, W.C.; Kang, S.K.; Beitz, A.J.; Lee, J.H. Bee venom injection into an acupuncture point reduces arthritis associated edema and nociceptive responses. **Pain**, v.90, n.3, 2001.

LAMYAA, K.B.; RAED, T.Y. The Effect of Whole Honey Bee Venom (*Apis mellifera*) on Reducing Skin Infection of Rabbits Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: An In vivo Study, **J Pure Appl Microbiol**, v.12, n.4, 2018.

LEANDRO, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. **An Acad Bras Cienc**, v. 87, n. 1, 2015.

LEE, S. M.; YANG, E. J.; CHOI, S. M.; KIM, S. H.; BAEK, M. G.; JIANG, J. H. Effects of Bee Venom on Glutamate-Induced Toxicity in Neuronal and Glial Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID: 368196 p. 1-9, 2012.

LEITE, G.L.D.; ROCHA, S.L. Apitoxina. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v.7, n.1, p.115-125, 2005.

LIMA PR, BROCHETTO-BRAGA. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Anim. Toxins Incl Trop Dis.**; v.9, n.2, p.149-162,2003.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 271-277, 1995.

MATYSIAK, J.; SCHMELZER, C. E. H.; NEUBERT, R. H. H.; KOKOT, Z. J. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, n. 2, p. 273-278, 2011.

MEDINA, C. O; LOUCHARD, B. O; GONÇALVES, T. Análise espectrofotométrica da atividade fotoprotetora in vitro de extratos das folhas de *Byrsonima sericea*. **Revista de Ciências Básica e Aplicada**, Vol.3, n 36, 2015.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MELO, M.R.; SIQUEIRA, A.P.N.D.F. Desenvolvimento de uma loção fotoprotetora, avaliação da estabilidade e determinação in vitro do FPS. **Perquirere**, v.9, n.1, p.81-97, 2012.

MELO, A. P. S., FRANÇAL, E. B., MALTA, D. C., GARCIA, L. P.V. Mortalidade por cirrose, câncer hepático e transtornos devidos ao uso de álcool: Carga Global de Doenças no Brasil, 1990 e 2015. **Revista Brasileira Epidemiologia**. v. 20, p. 61-74, 2017.

MEYER, C. R.; WIESE, H. Breves noções de morfologia e anatomia das abelhas. In: WIESE, H. **Nova apicultura**, Porto Alegre: ed. Agropecuária, Cap. 3, 1985.

MIRAN J., et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.258, p.72–81, 2012.

MITCHELL, A. Africanized killer bees: a case study. **Critical Care Nurse**, v. 26, p.23-32, 2006.

MOREIRA, D. R. Apiterapia no tratamento de patologias, **Revista F@pciência**, Apucarana-PR. v.9, n. 4, p. 21 – 29, 2012.

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.

NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A. Apicultura: manejo e produtos. Jaboticabal: FUNEP, 2002.

OGAWA, H.; KAWAKAMI, Z.; YAMAGUCHI, T. Proprioceptors involved in stinging response of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, n. 10, p. 1358-1367, 2011.

OLIVEIRA, M. E. C.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E. D. Apicultores do Estado de Sergipe, Brasil. **Scientia Plena**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2010.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 173-194, 2011.

PARK, H.J.; LEE, S.H.; SON, D.J.; OH, K.W.; KIM, K.H.; SONG, H.S.; KIM, G.J.; OH, G.T.; YOON, D.Y.; HONG, J.T. Antiarthritic effect of bee venom: inhibition of inflammation mediator generation by suppression of nf-kappab through interaction with the p50 subunit. **Arthritis Rheum**, v.50, n.11, 2004.

PARK, D., JUNG, J.W., LEE, M.O., LEE, S.Y., KIM, B., JIN, H.J., KIM, J., AHN, Y.J., LEE, K.W., SONG, Y.S., HONG, S. Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Peptides** 53, 2014a.

PARK, D., JUNG, J.W., LEE, M.O., LEE, S.Y., KIM, B., JIN, H.J., KIM, J., AHN, Y.J., LEE, K.W., SONG, Y.S., HONG, S. Functional characterization of naturally occurring melittin peptide isoforms in two honey bee species, *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Peptides**, v.53, 2014b.

PEREIRA, F. de M., LOPES, M. T. do R., CAMARGO, R. C. R. de, VILELA, S. L. de O., **Sistema de Produção de Mel**. Embrapa Meio-Norte. Jul, 2003.

POKORNÝ, J. Are natural antioxidants better - and safer - Than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, n.6, p. 629-642, 2007.

PORTO, I.C.C.M., OLIVEIRA, D.C., RAELE, R.A., RIBAS, K.H.S., MONTES, M.A.J.R.; CASTRO, C.M.M.B. Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. **Dental Materials**, 27, 221-228, 2011.

RATCLIFFE, N. A.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; BUTT, T. M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 10, p. 747-769, 2011.

ROESLER, R. et al. **Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RIGEL, D.S. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.58, n.1, p.129-132, 2008

ROMANHOLE, R. C., ATAIDE, J. A., CEFALLI, L. C., MORIEL, P., MAZZOLA, P. G. Photostability study of commercial sunscreens submitted to artificial UV irradiation and fluorescent radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **Biology**, v. 162, p. 45-49, 2016.

RÜNGER, T.M.; KAPPES, U.P. Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, v.24, n.1, p.2-10, 2008

SAEWAN, N., JIMTAISON, Natural products as photoprotection. **Journal of Cosmetic Dermatology**. v. 14, p. 47- 63, 2015.

SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO Jr., A.; ORSI, R. de O.; FERREIRA- JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1473-1479, 2010.

SCHALKA, Sérgio; et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. **An. Bras. Dermatol.** v.89, n.6, p.1-74, 2014.

SILVA, J., MONGE-FUENTES, V., GOMES, F., LOPES, K., DOS ANJOS, L., CAMPOS, G., ARENAS, C., BIOLCHI, A., GONÇALVES, J., GALANTE, P., CAMPOS, L., MORTARI, M. Pharmacological alternatives for the treatment of neurodegenerative disorders: wasp and bee venoms and their components as new neuroactive tools. **Toxins** (Basel), v.7, n.8, 2015

SOKOL, P.T.; HU, W.; YI, L.; TORAL, J.; CHANDRA, M.; ZIAI, M.R. Cloning of an apamin binding protein of vascular smooth muscle. **Journal of Protein Chemistry**, v.13, n.1, p. 117-128, 1994.

SON, D.J.; LEE, J.W.; LEE, Y.H.; SONG, H.S.; LEE, C.K.; HONG, J.T. Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacol. Ther.** v.115, n.2, 2007.

SUN, G. Y.; XU, J.; JENSEN, M. D.; SIMONYI, A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 205-213, 2004.

TRINDADE, M.S.A.; SOUSA, A.H.; VASCONCELOS, W.E.; FREITAS, R.S.; SILVA, A.M.A.; PEREIRA, D.S.; MARACAJÁ, P.B. Avaliação da polinização e estudo comportamental de *Apis mellifera* L. na cultura do meloeiro em Mossoró, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2004.

TOYOSHIMA, M.; HOSODA, K.; HANAMURA, M.; OKAMOTO, K.; KOBAYASHI, H.; NEGISHI, T.; Alternative methods to evaluate the protective ability of sunscreen against photogenotoxicity. **J Photochem Photobiol B**, v. 73, p. 59-66, 2004.

VÉLEZ, G.M. Insuficiencia renal aguda por picadura múltiple de abejas africanizadas. **Nefrologia**, v.30, n.5, p.531-8, 2010.

YANG, E. J.; KIM, S. H.; YANG, S. C.; LEE, S. M.; CHOI, S. M. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 69-78, 2011

YOON, M-H.; LEE, D-W.; KIM, H-J.; CHUNG, J-Y.; DOO, A-R.; PARK, H-J.; KIM, S-N.; CHOE, B-Y. Investigation of the neuroprotective effects of bee-venom acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease by using immunohistochemistry and In-vivo1H magnetic resonance spectroscopy at 9.4 T. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 62, n. 2, p. 320-327, 2013.

YOUNG, I. S., & WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v.54, n.3, p.176-186, 2001.

YUSUF, N., IRBY, C., KATIYAR, S. K., & ELMETS, C. A. Photoprotective effects of green tea polyphenols. **Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine**, v. 23, p. 48–56, 2007.

ZHANG, S.; et al. Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. **Toxicon**, v.148, 2018.

ZHOU, J.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; SHEN, J.; QI, Y.; XUE, X.; LI, Y.; WU, L.; ZHANG, J.; CHEN, F.; CHEN, L. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 404, n. 2, p. 171-178, 2010.

ZHU, F., WONGSIRI, S.. A brief introduction to apitherapy healthcare. J. Thai Tradit. **Altern. Med.**, v.6, n. 3, 2008.

CAPÍTULO I

6. ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, GENOTÓXICA, ANTIGENOTÓXICA E ANTINEOPLÁSICA DA APITOXINA PRODUZIDA POR *Apis mellifera* NO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.

**ANTIOXIDANT, GENOTOXIC, ANTIGENOTOXIC AND ANTINEOPLASIC
ACTIVITIES OF APITOXIN BY *Apis mellifera* IN RIO GRANDE DO NORTE
SEMIARID, BRAZIL.**

Atividades antioxidante, genotóxica, antigenotóxica e antineoplásica da apitoxina produzida por *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil

Geysa Almeida Viana, Carlos Ibere Alves Freitas, Victor Hugo V. Rodrigues, Wesley Adson Costa Coelho, Jael Soares Batista

ABSTRACT.- Viana G.A., Freitas C.I.A, Rodrigues V.H.V, De Sousa D.M.N, Coelho W.A.C, De Almeida J.G.L. & Batista J.S. 2019. [**Antioxidant, genotoxic, antigenotoxic and antineoplastic activities of apitoxin by *Apis mellifera* in Rio Grande do Norte semiarid, Brazil.**]. Atividades antioxidante, genotóxica, antigenotóxica e antineoplásica da apitoxina produzida por *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Journal of Apicultural Research 00(0):00-00. Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: geysaalmeidav@hotmail.com

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the antioxidant, genoprotective and antineoplastic activities *in vitro* of apitoxin produced by the bee *Apis mellifera* in the semiarid of Rio Grande do Norte. Therefore, the antioxidant activities of the aqueous solution of apitoxin were evaluated by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, as well as the *in vitro* evaluation of its genotoxic and antigenotoxic potential through the comet assay. *In vitro* antineoplastic activity in human tumor cell lines: poststrate adenocarcinoma (PC3), hepatocellular carcinoma (HEPG2), melanoma (MAD-MB435) and astrocytoma (SNB19) were verified by the MTT [3-(4-bromide) colorimetric method, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium]. Apitoxin had no genotoxic effect on L929 cells at concentrations of 30 µg / mL, 10 µg / mL and 5 µg / mL after 24 hours of exposure. Also at all tested concentrations apitoxin promoted a significant reduction in the DNA damage index (idDNA) when compared to the positive control (cells treated with the genotoxic substance H₂O₂). At 30 µg / mL, apitoxin attenuated the genotoxic effects induced by H₂O₂, since at that concentration the percentage reduction in genotoxicity was 51.2 ± 10.6 µg / mL. Apitoxin also demonstrated *in vitro* antineoplastic potential, since at concentrations of 50 µg / mL and 25 µg / mL, cytotoxic effect was observed with significant reduction of viability percentages of human prostate adenocarcinoma (PC3) tumor cell lines, hepatocellular carcinoma (HEPG2), melanoma (MAD-MB435) and astrocytoma (SNB19). In addition, apitoxin was able to inhibit cell viability more efficiently in tumor lineages compared to non-neoplastic normal (L929) cells, suggesting a selective action. The high antioxidant activity evidenced, associated with the absence of genotoxic effect, genoprotective effect and antineoplastic effect provide indications of the therapeutic potential of apitoxin.

INDEXING TERMS: Northeast Brazil, Genotoxic and genoprotective effects, *in vitro* antitumor activity.

RESUMO: Este estudo objetivou avaliar as atividades antioxidante, genoprotetora e antineoplásica *in vitro* da apitoxina produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte. Para tanto, foram avaliadas as atividades antioxidante da solução aquosa de apitoxina através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), bem como a avaliação *in vitro* do seu potencial genotóxico e antigenotóxico através do ensaio cometa. A atividade antineoplásica *in vitro* nas linhagens de células tumorais humanas de adenocarcinoma de próstata (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), melanoma (MAD-MB435) e astrocitoma (SNB19) foram verificadas através do método colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. A apitoxina não exerceu efeito genotóxico em células da linhagem L929 nas concentrações de 30 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL após 24 horas de exposição, sendo apenas evidenciado esse efeito na concentração de 50 µg/mL. Também, em todas as concentrações testadas, a apitoxina promoveu redução significativa do índice de dano ao DNA (idDNA) quando comparado ao controle positivo (células tratadas com a substância genotóxica H₂O₂). Na concentração de 30 µg/mL a apitoxina atenuou os efeitos genotóxicos induzidos pelo H₂O₂, uma vez que na referida concentração o percentual de redução da genotoxicidade foi de 51,2 ± 10,6 µg/mL. A apitoxina também demonstrou um potencial antineoplásico *in vitro*, uma vez que nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL foram observados efeito citotóxico, com redução significativa dos percentuais de viabilidade das linhagens de células tumorais humanas de adenocarcinoma de próstata (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), melanoma (MAD-MB435) e astrocitoma (SNB19). Além disso, a apitoxina foi capaz de inibir a viabilidade celular de forma mais eficiente nas linhagens tumorais quando comparada com células normais (L929) não neoplásicas, sugerindo uma ação seletiva. A alta atividade antioxidante evidenciada, associada à ausência de efeito genotóxico, genoprotetor e antineoplásico fornecem indícios das potencialidades terapêuticas pela apitoxina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Veneno abelha, Nordeste-Brasil, Efeitos genotóxico e genoprotetor, atividade antitumoral *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Dentre os produtos de origem apícola, a apitoxina tem se destacado, por apresentar importantes propriedades terapêuticas e suscitado interesse da indústria farmacêutica para extração de novos princípios bioativos a serem utilizados na fabricação de medicamentos (CHERNIACK, 2010; RATCLIFFE *et al.*, 2011). *Apitoxina* (do latim: *apis* - abelha e *toxikon* – veneno) é o veneno produzido pela *Apis mellifera*, por meio de duas glândulas localizadas no interior do abdômen da abelha operária, com objetivo de proteger a colônia contra a extensa variedade de predadores, que vão desde outros artrópodes a vertebrados (SCIANI *et al.*, 2010; ORŠOLIC, 2012; RATCLIFFE *et al.*, 2011).

A composição da apitoxina consiste de 88 % água, e os 12% restantes contém diversos componentes (LEANDRO, *et al.*, 2015), podendo essa composição variar em função da idade, da sazonalidade e entre regiões geográficas (FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010; SCIANI *et al.*, 2010). Dentre os componentes os que mais se destacam são a melitina e a fosfolipase A₂, que representam juntas cerca de 75% do seu peso seco (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010).

Estudos mostram que o veneno da abelha apresenta diversas atividades terapêuticas, como hemolítica, analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica (ZHOU *et al.*, 2010; ORSOLIC, 2011; YANG *et al.*, 2011), antinociceptiva (KIM *et al.*, 2003), hepatoprotetora (PARK *et al.*, 2010) antiviral e antitumoral (ZHOU *et al.*, 2010; ORSOLIC, 2011; RATCLIFFE *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2011). A apitoxina também tem apresentado potencial terapêutico significativo no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA) (YANG *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2012), Alzheimer (SUN *et al.*, 2004) e a doença de Parkinson (DOO *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011a,b; CHUNG *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012; YOON *et al.*, 2013). Sua utilização na indústria de cosméticos também tem sido bastante explorada nos últimos tempos, principalmente como auxiliar no retardo do envelhecimento (HAN; LEE; PARK, 2012).

Devido ao reconhecimento de suas propriedades terapêuticas no meio científico, a apitoxina configura-se como um recurso altamente relevante a ser continuamente explorado, onde apesar de resultados científicos serem encorajadores, mais pesquisa são necessárias, especialmente com modelos humanos, antes que a comunidade médica passe a usar o veneno de abelha como indicação terapêutica no tratamento para doenças (RATCLIFFE *et al.*, 2011).

O maior conhecimento da atividade biológica da apitoxina extraída de colmeias no Nordeste brasileiro poderá contribuir para valorização do produto e ampliar o mercado para sua comercialização, dessa forma, o presente estudo teve como objetivos avaliar as atividades antioxidante, genoprotetora e anti neoplásica in vitro da apitoxina produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras da Apitoxina

As amostras da apitoxina da abelha *Apis mellifera* foram coletadas no distrito de Dom Marcolino, Maxaranguape, no estado do Rio Grande do Norte, a partir do mês de julho de 2017. A técnica utilizada para coleta foi a mesma proposta por Gramacho, Malaspina e Palma (1992), por estimulação elétrica, onde as placas coletoras foram colocadas na entrada das colmeias e conectadas a um dispositivo que promove impulsos elétricos (Figura 1). Esses impulsos provocaram um choque nas abelhas, que logo em seguida ferroaram a placa como forma de defesa, liberando o veneno na forma líquida, que ficou depositado entre o vidro da placa e o material protetor do equipamento.

Após secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40°C, durante 48 horas, o veneno foi raspado do vidro (Figura 2), pesado em balança analítica de precisão e em seguida preparada uma solução de 50 mg/mL utilizando-se água destilada como diluente. A solução pronta foi então armazenada em recipiente de vidro âmbar, envolvido em papel laminado e acondicionada em freezer (-20 °C) até o momento do uso.

As técnicas de coleta utilizada seguiram as determinações da Instrução Normativa N° 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura, visando uma amostra com padrão de qualidade.



Figura 1. Coleta das amostras de apitoxina de *A. mellifera* obtidas no semiárido do Rio grande do Norte. Fonte: Arquivo pessoal, 2016.



Figura 2. Amostra de apitoxina de *A. mellifera* obtida na região do semiárido norterigrandense Fonte: Arquivo pessoal, 2016.

Obtenção e cultivo das células tumorais

As células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade estão listadas abaixo quanto ao tipo histológico e a origem (tabela 1).

Tabela 1. Linhagem, tipo histológico e origem das células tumorais utilizadas nos ensaios de citotoxicidade.

Linhagem celular	Tipo histológico	Origem
PC3	Adenocarcinoma de próstata	Humana
HEPG2	Carcinoma hepatocelular	Humana
MDA-MB435	Melanoma	Humana
SNB19	Astrocitoma	Humana
L929	Fibroblasto	Murino

As linhagens tumorais foram provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), e fornecidas pela Biotechcell®, empresa incubada à Universidade Federal do Ceará (UFC). As células foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (75 cm², volume de 250mL) em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina), sendo posteriormente incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O crescimento celular foi observado com a ajuda de um microscópio de inversão a cada 24 horas.

Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Mensor *et al.* (2001). Para isso, a solução da apitoxina na concentração de 1mg/mL foi diluída gradativamente em metanol, resultando em diferentes concentrações (1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1mg/mL). Um mililitro de cada concentração foi posta em tubos de ensaio juntamente com 1,5mL de uma solução metanólica de DPPH 60µmol.L⁻¹. Após 15 minutos foi medida a absorbância das amostras em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517nm, tendo como branco somente o metanol.

O ácido ascórbico foi utilizado neste experimento como controle positivo, nas mesmas concentrações das amostras em teste. A porcentagem de inibição referente a cada concentração

da solução da apitoxina foi obtida a partir da relação da absorbância do mesmo com a absorbância de uma solução contendo 1mL de metanol e 1,5mL da solução de DPPH.

A capacidade de inibir o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{\text{A controle (-)} - \text{A amostra}}{\text{A controle (-)}} \times 100$$

Foi construída a curva padrão de DPPH plotando-se o valor médio das absorbâncias obtidas pelas concentrações da solução. Após a obtenção dos valores percentuais de inibição do radical livre, os mesmos foram analisados em Software Origin 7.0 com a finalidade de se obter um gráfico que apresentasse valores pelo quais seria calculada a concentração inibitória de 50% do radical DPPH (IC50), que seria a concentração da amostra necessária para consumir 50% do DPPH.

Avaliação do potencial genoprotetor

Foi avaliado o efeito genoprotetor da solução de apitoxina em fibroblastos da linhagem L929 ($0,7 \times 10^5$ células/mL), cultivadas em DMEM (Dulbecco modification of Minimum Essential Media; GIBCO®), suplementadas com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram expostas ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; 150 μM por 2h de exposição) para indução da genotoxicidade (controle positivo) e a água destilada estéril (controle negativo). As culturas celulares também foram co-tratadas com concentrações crescentes de amostras da solução com apitoxina (50, 30, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$) e H_2O_2 (150 μM), durante 2h a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 (grupo teste).

As células foram homogeneizadas em agarose 0,8% e espalhadas em lâminas preparadas, as quais foram mergulhadas em solução de lise por 1h, seguida de neutralização. Posteriormente, as lâminas foram mantidas em tampão de eletroforese a 4°C por 20 minutos, seguido de corrida por 20 minutos, 1,6Vcm⁻¹. As lâminas foram coradas em uma solução de brometo de etídio (20 $\mu\text{g/mL}$) e analisadas com o auxílio de microscópio de fluorescência.

O grau de lesão do DNA foi identificado visualmente através da análise da cauda formada pelos fragmentos de DNA, sendo que o tamanho da cauda foi proporcional à dimensão do dano causado (Mezzalana *et al.* 2014). Foram analisados 100 cometas por lâmina e classificados por

análise visual, dentre cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de lesão sofrido pela célula (Lovell *et al.* 1999).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula: $ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$, onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4).

O efeito de proteção das amostras testes sobre a genotoxicidade induzida pelo H₂O₂ (50µM por 2h de exposição) foi calculado de acordo com Waters *et al.* (1990), segundo a fórmula: % Redução=(A-B/A-C) x100, onde A corresponde ao ID induzido pelo H₂O₂, B corresponde ao ID induzido pelo tratamento genoprotetor (H₂O₂ + amostra teste) e C corresponde ao ID atribuído ao controle negativo (água destilada).

Avaliação da atividade antineoplásicas *in vitro*

O potencial antineoplásico *in vitro* da apitoxina foi avaliado por meio do efeito citotóxico da apitoxina em quatro linhagens de células tumorais humanas: adenocarcinoma de pâncreas (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), melanoma (MAD-MB435), astrocitoma (SNB19) e em linhagem de células sadias não neoplásicas, fibroblastos (L929), que foram utilizadas para comparação e avaliação do efeito seletivo da citotoxicidade da apitoxina entre as células tumorais e normais.

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada utilizando o método colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5dimetiltiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] por meio da metodologia descrita por Mosman em 1983. As células foram distribuídas em placas de 96 poços e expostas em diferentes concentrações da solução aquosa de apitoxina: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625 e 0,78125µg/mL (Figura 3). As placas foram incubadas por 72 h, com 5 % de CO₂ e a 37 °C. Posteriormente, foi realizada a adição de 10 µL do reagente MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹ em todos os poços da placa, sendo a placa novamente incubada por 4 horas com 5% de CO₂ à 37°C.

Após esse período, a absorbância das soluções resultantes foi medida com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm. O ensaio foi realizado em três triplicatas em três experimentos independentes. O quimioterápico doxorrubicina na concentração de 5 µg.mL⁻¹ foi utilizado como controle positivo do teste e como controle negativo foi utilizado o solvente da amostra (água destilada).

A viabilidade celular (porcentagem de sobrevivência celular), foi estimada pela seguinte equação:

$$\% \text{ CS} = \frac{\text{Absorbância das amostras teste} - \text{Absorbância do controle negativo}}{\text{Absorbância controle positivo} - \text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

Os resultados estão expressos em percentual de média $\pm$ desvio padrão de viabilidade de células relativo ao controle negativo (considerando 100% de viabilidade).

	1	AM ₁	AM ₁	AM ₁	AM ₂	AM ₂	AM ₂	AM ₃	AM ₃	AM ₃	-	-
A	BR	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	-	-
B	BR	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	C7	-	-
C	BR	C6	C6	C6	C6	C6	C6	C6	C6	C6	-	-
D	BR	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	C5	-	-
E	BR	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	C4	-	-
F	BR	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	-	-
G	BR	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	-	-
H	BR	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	-	-

Figura 3. Esquema demonstrativo da placa de 96 poços utilizada nos ensaios de citotoxicidade para avaliar a viabilidade celular pelo método MTT. BR = branco, C1 – C7 = concentrações testadas das amostras, AM₁ = dados brutos do 1º experimento, AM₂ = dados brutos do 2º experimento e AM₃ = dados brutos do 3º experimento. **BR = branco, C- = controle negativo (células + veículo), D1 – D10 = concentrações testadas da amostra teste.** Fonte: Biotech Cell, 2016.

Cálculo do Índice de Citotoxicidade de 50% (IC₅₀)

A partir dos dados de viabilidade obtidos para cada concentração das amostras avaliadas, foi determinado o Índice de Citotoxicidade de 50% (IC₅₀), correspondente à concentração da amostra capaz de induzir 50% de citotoxicidade, para cada linhagem celular testada, os quais foram comparadas e com a IC₅₀ da doxorubicina.

Os dados médios das absorbâncias obtidos das amostras teste, controle positivo e controle negativo foram comparados por análise de variância ANOVA seguida do pós-teste de Tukey utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software), com nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antioxidante

Em relação aos resultados da avaliação da atividade antioxidante da apitoxina, foi demonstrada a sua habilidade em sequestrar radicais livres, uma vez que a solução metanólica de DPPH inicialmente de coloração violeta tornou-se amarela (Figura 4). Desta forma, as leituras das absorbâncias indicaram que todas as concentrações avaliadas apresentam atividade antioxidante.

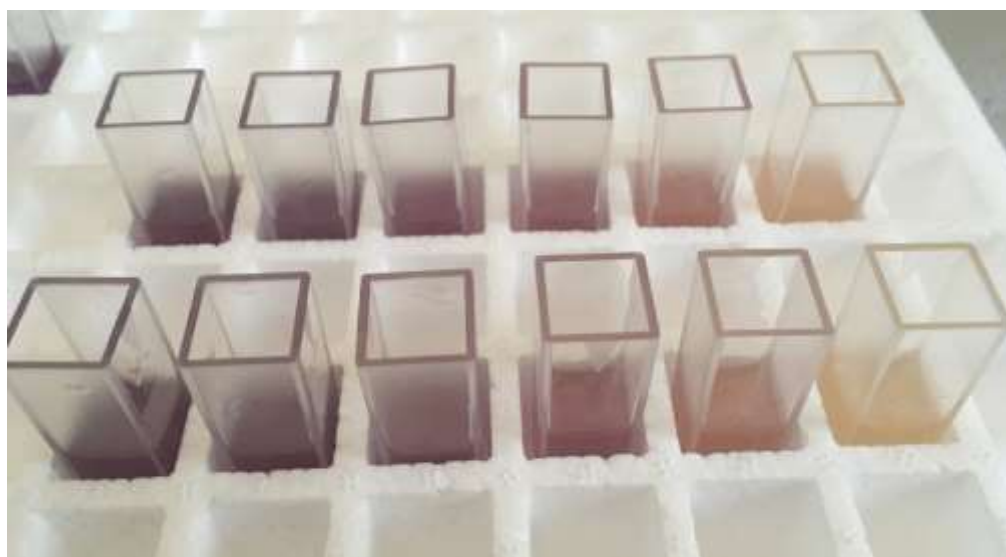


Figura 4. Solução metanólica indicando o consumo do DPPH, inicialmente de coloração violeta tornando-se amarela. Fonte: Arquivo pessoal, 2017.

O gráfico obtido pelos percentuais de inibição (% DPPH consumido) nas diferentes concentrações da apitoxina demonstrou padrão linear, ou seja, quanto maior a concentração da solução, maior foi o consumo de DPPH e menor foram as absorbâncias (Figura 5). Os maiores percentuais de inibição do DPPH foram obtidos nas concentrações de 1mg/mL e 0,8mg/mL, que foram respectivamente de 74,92% e 60,85%.

A capacidade sequestrante do radical DPPH pode ser representada pelos valores da IC50 (%), que é um parâmetro indicativo da concentração inibitória necessária para diminuir em 50% o radical livre DPPH (IC50) (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Em geral, quanto menor o valor da IC50 (%), maior a capacidade sequestrante do radical e, portanto, maior a atividade antioxidante

(CAMPOS, *et al.*, 2012). Os resultados mostram que a capacidade inibitória da solução de apitoxina (IC50) foi de 0,648 mg/mL. Dessa forma, quando comparado ao antioxidante padrão ácido ascórbico (IC50=0,255 mg/mL), substância de referência frequentemente utilizado nas análises de atividade antioxidante pela capacidade de reduzir rapidamente o DPPH, podemos considerar que a apitoxina apresentou boa atividade antioxidante.

Embora existam muitos estudos disponíveis na literatura nacional relacionados à avaliação da atividade antioxidante em ensaio de sequestro do radical DPPH de produtos apícolas tais como própolis, pólen e mel (FROZZA *et al.*, 2013; KHALIL *et al.*, 2010; ALIČIĆ *et al.*, 2014), o mesmo não ocorre com a apitoxina. No entanto, a literatura internacional contempla artigos nos quais confirmam o grande potencial antioxidante do veneno produzido por abelhas do gênero *Apis*.

Sobral *et al.* (2016) obtiveram IC50 = 0,225 mg/mL em amostras do veneno produzido pela *Apis mellifera iberiensis* do Nordeste de Portugal. Mokosuli *et al.* (2013) ao avaliar a bioatividade de amostras de veneno de abelhas no Norte da Ilha de Sulawesi, Indonésia, demonstraram que 500 ppm de veneno de *Apis nigrocinta* foi capaz de inibir a oxidação de ácido linoleico em 75,10%, enquanto que o veneno produzido por *A. Dorsais* em uma concentração de 200 ppm foi capaz de inibir em 80,78%.

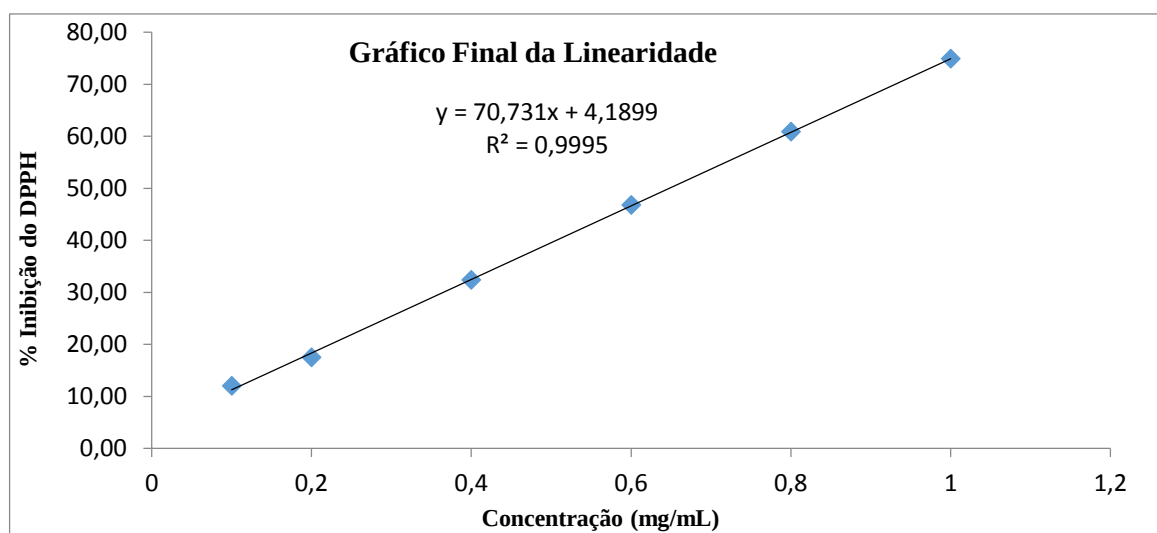


Figura 5. Equação da reta, em função da concentração da solução de apitoxina com suas respectivas absorbâncias.

Atividade genotóxica e antigenotóxica

Neste estudo, utilizou-se o ensaio cometa para determinar os efeitos genotóxicos da apitoxina, utilizando a substância genotóxica H₂O₂, que promove danos oxidativos ao DNA. Também, com o objetivo de avaliar o efeito antigenotóxico da apitoxina, fibroblastos da linhagem L929 foram expostos ao H₂O₂ e co-tratadas com três concentrações diferentes da solução aquosa de apitoxina.

Os resultados evidenciaram que a apitoxina não apresentou efeito genotóxico sobre fibroblastos murinos (L929) nas concentrações de 30, 10 e 5 µg/mL testadas, sendo esse efeito apenas evidenciado na concentração de 50 µg/mL, após 24 h de exposição. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores médios dos índices de dano ao DNA (idDNA) das células L929 tratadas com solução aquosa de apitoxina (grupo teste) nas concentrações de 30, 10 e 5 µg/mL e água destilada estéril (controle negativo), enquanto que a apitoxina promoveu nas concentrações citadas, redução significativa do idDNA, quando comparado ao controle positivo, células tratadas com a substância genotóxica H₂O₂ (Tabela 2).

Além disso, a apitoxina na concentração de 30 µg/mL atenuou moderadamente os efeitos genotóxicos induzidos pelo H₂O₂, uma vez na referida concentração o percentual de redução da genotoxicidade foi de $41,2 \pm 10,6$, demonstrando assim, efeito satisfatório enquanto protetor a danos no DNA celular e potencial antigenotóxico (Tabela 3). A redução percentual de genotoxicidade indica que a apitoxina reduz danos genéticos causados pelos radicais livres. Esse efeito foi mediado pela atividade antioxidante da apitoxina, conforme demonstrado no presente estudo, onde a apitoxina apresentou boa atividade antioxidante (IC₅₀= 0,648 mg/mL). Assim, a apitoxina interagiu com o H₂O₂, bloqueando seu efeito deletério ao DNA, exercendo, consequentemente atividade genoprotetora, protegendo assim o DNA.

A exposição aos denominados agentes genotóxicos, os quais interagem com o DNA produzindo modificações em sua estrutura ou função, pode interferir em processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição e como consequência levar à morte celular e induzir mutações que causam câncer (HOEIJMAKERS, 2009). Neste contexto, a Toxicologia genética é uma área que tem se dedicado à identificação e estudo dos mecanismos de ação de agentes que produzem efeitos tóxicos ao material genético (AQUINO, 2010).

Portanto, os estudos de genotoxicidade ajudam na avaliação da segurança e da efetividade dos produtos naturais (BAST, 2002). Assim, pesquisas por agentes que possam reduzir a frequência de alterações no DNA têm se mostrado promissoras e com importantes implicações

nas práticas terapêuticas devido à possibilidade da redução da taxa de mutações e consequente diminuição na incidência de doenças ligadas a alterações do material genético da célula (MARTINI *et al.* 2012).

Não existem na literatura estudos de avaliação de efeito genoprotetor da apitoxina utilizando ensaio cometa, o que ressalta o ineditismo deste estudo. A constatação de que a apitoxina pode agir como antioxidante é de grande interesse, tendo em vista que conforme a literatura, ao efeito deletério sobre o DNA e outras moléculas endógenas, está a ocorrência de doenças como o câncer, a diabetes, artrite, doenças cardiovasculares e até mesmo disfunções cerebrais e envelhecimento, entre outras. (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Tabela 2. Média $\pm$ desvio-padrão dos índices de dano ao DNA (idDNA), analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotóxico da apitoxina, após exposição de fibroblastos da linhagem L929, por 24 em três concentrações da solução aquosa de apitoxina, ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a água destilada estéril.

Parâmetro	Concentração da solução aquosa de apitoxina (µg/mL)				Controle +	Controle -
	5	10	30	50		
IdDNA	8,15 $\pm$ 2,36c	8,66 $\pm$ 2,5c	12,33 $\pm$ 2,87c	29,11 $\pm$ 3,88b	176,33 $\pm$ 21,00a	7,88 $\pm$ 2,66c

a,b Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significam diferença estatística ($p < 0.05$) e as médias da mesma linha seguidas por letras iguais são estatisticamente iguais. IdDNA: Índice de dano ao DNA; controle positivo (+): Peróxido de hidrogênio (H₂O₂); controle negativo (-): Água destilada.

Tabela 3. Média $\pm$ desvio-padrão do percentual de redução de genotoxicidade, analisados pelo ensaio cometa para avaliação do efeito genoprotetor da apitoxina em fibroblastos da linhagem L929, co-tratadas com três concentrações da solução aquosa de apitoxina.

Parâmetro analisado	Concentração da solução de apitoxina (µg/mL)		
	5	10	30
% de redução da genotoxicidade	7,29 $\pm$ 6,67	18,47 $\pm$ 2,64	51,2 $\pm$ 10,6

Atividade antineoplásica

No intuito de determinar a atividade antineoplásica da apitoxina, avaliamos o efeito citotóxico *in vitro* da apitoxina na viabilidade de células tumorais humanas das linhagens adenocarcinoma de próstata (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), astrocitoma (SNB19), melanoma (MAD-MB435). As células foram expostas a diferentes concentrações da solução de apitoxina por 72 horas e a viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de MTT.

Devido à praticidade, sensibilidade, rapidez e baixo custo o método por MTT é um dos ensaios mais amplamente utilizados para avaliar o efeito citotóxico de diversos compostos, sendo um dos testes mais utilizados pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) para uso em programas de avaliação da atividade antineoplásica na rotina de triagem de drogas anticâncer (MOSMANN, 1983).

Pode-se verificar que a apitoxina foi citotóxica para todas as linhagens neoplásicas, demonstrando que a capacidade de reduzir a viabilidade foi concentração dependente. Nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL foram observados baixos percentuais de viabilidade celular em todas as linhagens de células neoplásicas testadas. Quando comparado os percentuais de viabilidade nas diferentes concentrações testadas, observou-se que em todas as linhagens testadas houve redução significativa dos percentuais de viabilidade celular nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL em relação aos valores obtidos nas demais concentrações. Também, foi possível constatar que na concentração de 12,5 a apitoxina exerceu moderada atividade citotóxica em todas as linhagens testadas. Na referida concentração, o percentual de viabilidade diferiu significativamente em relação as demais concentrações. Em todas as linhagens celulares testadas, observou-se que a partir da concentração de 6,25 µg.mL⁻¹ a apitoxina não apresentou atividade citotóxica, sendo observados altos valores de viabilidade celular e ausência de diferenças significativas dos valores percentuais de viabilidade entre as concentrações de 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,5625 µg/mL e 0,78125 µg/mL (Tabela 4).

Ao analisar a atividade citotóxica da apitoxina sobre células normais não neoplásicas, foi possível constatar que nas concentrações de 50 µg/mL e 25 mg mL, apitoxina interferiu pouco na viabilidade das células L929, enquanto que nas referidas concentrações a apitoxina apresentou potencial citotóxico relevante em todas as linhagens de células neoplásicas testadas. Desta forma é possível sugerir que a apitoxina exerceu uma ação seletiva, uma vez que nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL a apitoxina foi capaz de inibir a viabilidade celular de forma mais eficiente nas linhas tumorais investigadas.

Nosso estudo demonstra resultados mais satisfatório que estudo anterior, cujo crescimento de células neoplásicas de carcinoma hepatocelular foi inibido pelo veneno de abelha com IC₅₀ maior que 10 µg / ml (WANG *et al.*, 2009). Além disso, corrobora com o estudo desenvolvido por Park *et al.* (2010b), que demonstraram que em doses semelhantes ou mais altas (1–15 µg /ml) o veneno de abelha e melitina inibiram o crescimento de células de câncer de próstata.

Apesar dos estudos realizados e dos investimentos aplicados em pesquisas nas áreas de química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos, os quimioterápicos convencionais empregados atualmente no tratamento do câncer apresentam elevada toxicidade por serem

pouco seletivos (CHEN *et al.*, 2013). Nesse contexto o principal objetivo dos estudos na quimioterapia é a busca por novos fármacos seletivos que sejam capazes de destruir apenas células tumorais, preservando as células normais (ANAZETTI *et al.*, 2003). Assim, a constatação do efeito seletivo da apitoxina é uma característica extremamente importante para uma possível utilização como agente natural, que possui atividade antineoplásica.

A determinação do valor de IC₅₀ é uma etapa importante em estudos de citotoxicidade. Como descrito, às células foram submetidas a concentrações variadas da solução aquosa de apitoxina com a finalidade de determinar a concentração que provocasse a morte significativa em 50% do total de células testadas. Ao analisar os valores de IC₅₀ encontrados no presente estudo foram encontrados valores que variaram de 3.970µg/µg/mL a 9.845µg/mL, para as linhagens HEPG2 a MAD-MB435, respectivamente. Enquanto que para células não neoplásicas L929, o valor de IC₅₀ foi de 9,45 µg/mL (Tabela 5). A doxorrubicina, utilizada como quimioterápico de referência, também apresentou valores de IC₅₀ que variaram de 0,10 µg/mL a 0,48 µg/mL para as linhagens de PC3 a SNB19, respectivamente. Ao analisar estes resultados, podemos considerar os valores de IC₅₀ como satisfatórios para todas as linhagens neoplásicas testadas.

Os baixos valores de IC₅₀ obtidos podem ser traduzidos como uma maior sensibilidade dessas células à apitoxina. É importante ressaltar que, como parâmetro de atividade antitumoral, o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer, considera como compostos ativos com atividade antineoplásica, os compostos que apresentarem IC₅₀ < 30 µg.mL⁻¹ (ITHARAT *et al.*, 2004). Ainda segundo o referido Instituto, compostos que apresente tais valores de IC₅₀ merecem ser submetidos a análises de citotoxicidade mais detalhadas. Vale destacar ainda que houve redução significativa entre os valores de IC₅₀ das linhagens SNB19 e MAD-MB435 quando comparado ao valor do IC₅₀ obtido para células da linhagem L929. Esses resultados confirma que apitoxina apresenta seletividade em relação às linhagens de células normais e células neoplásicas.

Outros estudos também demonstraram resultados satisfatórios quanto ao potencial antitumoral da apitoxina. Liu *et al.* (2002), demonstraram que *in vivo* o veneno da abelha inibiu a proliferação de células de melanoma da linhagem B16 e promoveu a morte das células neoplásicas por induzir a apoptose e a fragmentação de DNA, sendo esses fatores considerados pelos referidos autores como os possíveis mecanismos através dos quais o veneno de abelha inibe o crescimento do tumor. Oršolić (2012) sugere que o mecanismo fundamental do efeito citotóxico do veneno da abelha ocorre através da ativação da fosfolipase A2 pela melitina. Miran *et al.* (2012) descobriram que o veneno de abelha e seu principal componente, a melitina, inibiu

o crescimento celular de células epiteliais de câncer de ovário humano (SKOV3 e PA-1), também através da indução de morte celular por apoptose, em uma dose dependente da concentração, com um valor de IC₅₀ de 1,5 e 3,8 µg / ml em células SKOV3 e 1,2 e 2,6 µg / ml em células PA-1, respectivamente.

Tabela 4. Efeito citotóxico da apitoxina produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, analisado pela técnica de MTT sobre linhagens tumorais humanas adenocarcinoma de pâncreas (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), astrocitoma (SNB19), melanoma (MAD-MB435), e célula não neoplásica fibroblasto (L929). As células foram tratadas com diferentes concentrações da solução de apitoxina por 72 horas. Os resultados estão expressos por porcentagem média ± desvio padrão de viabilidade de células.

	Linhagens				
Concentrações (µg/ml)	PC3	HEPG2	SNB19	MAD-MB435	L929
50	0.4 ± 0.28 ^{Da}	0.41 ± 0.17 ^{Da}	0.44 ± 0.25 ^{Ca}	0.41 ± 0.25 ^{Ca}	53.23 ± 1.98 ^{Ca}
25	4.18 ± 1.59 ^{Cb}	8.47 ± 6.11 ^{Ca}	0.54 ± 0.31 ^{Cc}	2.64 ± 0.31 ^{Cc}	56.25 ± 4.48 ^{CBa}
12.5	45.6 ± 5.55 ^{Ba}	39.14 ± 3.8 ^{Ba}	39.35 ± 7.6 ^{Ba}	39.35 ± 7.6 ^{Ba}	87.0 ± 5.41 ^{Ba}
6.25	78.07 ± 2.95 ^{Ab}	72.77 ± 3.9 ^{Ab}	78.48 ± 3.18 ^{Aa}	72.28 ± 3.18 ^{Aa}	94.94 ± 4.21 ^{Aa}
3.125	76.52 ± 1.08 ^{Ac}	74.52 ± 8.15 ^{Aa}	79.63 ± 2.48 ^{Ab}	75.22 ± 2.48 ^{Ab}	95.52 ± 3.11 ^{Aa}
1.5625	88.99 ± 4.96 ^{Ab}	78.09 ± 5.89 ^{Aa}	76.24 ± 2.94 ^{Ac}	79.32 ± 2.94 ^{Ac}	90.56 ± 4.17 ^{Aa}
0.78125	87.65 ± 6.49 ^{Aa}	82.76 ± 11.57 ^{Aa}	75.72 ± 7.15 ^{Aa}	81.55 ± 7.15 ^{Aa}	94.23 ± 2.6 ^{Aa}

^{A,B,C} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e ^{a,b,c} minúsculas diferentes na linha significam diferença estatística (p<0,05 – Tukey).

Tabela 5. Médias e desvios-padrão obtidos para os valores da concentração inibitória (IC₅₀) da apitoxina produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, frente às linhagens neoplásicas humana adenocarcinoma de pâncreas (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), astrocitoma (SNB19) e melanoma (MAD-MB435).

	Linhagens celulares - IC ₅₀ µg/mL				
Composto	PC3	HEPG2	SNB19	MAD-MB435	L929
Apitoxina	7.75 ^{Aa}	9.846 ^{Aa}	4.861 ^{Ab}	3.97 ^{Ab}	9.450 ^{Aa}
Doxorrubicina	0.10 ^{Bc}	0.20 ^{Bb}	0.48 ^{Ba}	0.40 ^{Ba}	0.20 ^{Bb}

^{A,B} Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na coluna e ^{a,b} minúsculas diferentes na linha significam diferença estatística (p<0,05 – Tukey).

CONCLUSÕES

A apitoxina produzida pela abelha *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte apresentou boa atividade antioxidante. O ensaio cometa indicou que a apitoxina não exerceu efeito genotóxico, exceto na concentração de 50 µg/mL, e promoveu efeito antígeno-tóxico por reduzir danos oxidativos em células da linhagem L929. A apitoxina também demonstrou um potencial antineoplásico *in vitro*, uma vez que nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL, foram observados efeito citotóxico com redução significativa dos percentuais de viabilidade das linhagens de células tumorais humanas de adenocarcinoma de próstata (PC3), carcinoma hepatocelular (HEPG2), melanoma (MAD-MB435) e astrocitoma (SNB19). Além disso, a apitoxina foi capaz de inibir a viabilidade celular de forma mais eficiente nas linhas tumorais quando comparada a com células normais não neoplásicas, sugerindo uma ação seletiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, C.Q., BRANDÃO, H.N., DAVID, J.M., DAVID, J.P., LIMA, L.S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. Diálogos e ciência – **Revista da rede ensino FTC**, v.5, n.12, p.7- 8, 2007.
- ALIČIĆ, D.; ŠUBARIĆ, D.; JAŠIĆ, M.; PAŠALIĆ, H.; AČKAR, Đ. Antioxidant properties of pollen. **Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku**, v.3, n.1, p.6-12, 2014.
- ANAZETTI, M.C., MELO, P.S., DURAN, N., HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.
- AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-9, 2008.
- BAST, A.; CHANDLER, R.F.; CHOY, P.C.; DELMULLE, L.M.; GRUENWALD, J.; HALKES, S.B.A.; KELLER, K.; KOEMAN, J.H.; PETER, P.; PRZYREMBEL, H.; REE, E.M.; RENWICK, A.G.; VERMEER, I.T.M. Botanical health products, positioning and requirements for effective and safe use . **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.12, p.195-211, 2002.
- BASTOS, E. M. A. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.
- CAMPOS, R.P., et al. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.) **Rev. Bras. Frutic.**, v. 34, n. 1, 2012.

CHEN, K. C., SCHMUCK K., TIETZE L, F., ROFFLER S, R. Selective cancer therapy by extracellular activation of a highly potent glycosidic duocarmycin analogue. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n, 5, p. 1773-1782, 2013.

CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in Neurobiology**, v. 92, n. 2, p. 151-183, 2010.

CHUNG, E. S.; KIM, H.; LEE, G.; PARK, S.; KIM, H.; BAE H. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 8, p. 1322-1330, 2012.

DE SOUZA, K.C.B.; BASSANI, V.L. LC- Determination of flavonóides: Separation of quercetin, luteonin and 3-o-methyl quercetil in Achyrocline satureoides preparation **J. Pharm. and Biom. Anal.**, 28, 771-7, 2002.

DOO, A. R.; KIM, S.T.; KIM, S. N.; MOON, W.; YIN, C. S.; CHAE, Y.; PARK, H. K.; LEE, H.; PARK, H. J. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridineinduced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, v. 32, p. 88-91, 2010.

FERREIRA-JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. de O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon**, v.56, n. 3, p. 355-362, 2010.

FROZZA C.O., GARCIA C.S., GAMBATO G., SOUZA M.D., SALVADOR M., MOURA S., PADILHA F.F., SEIXAS F.K., COLLARES T., BORSUK S., DELLAGOSTIN O.A., HENRIQUES J.A. & ROESCH-ELY M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food. Chem.* **Toxicol.** V.52, p.137-142, 2013.

GRAEFE, E.U., DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 37(5), 219-33, 1999.

GRAMACHO, K. P.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Avaliação da produtividade de veneno em abelhas africanizadas pela utilização da técnica de coleta por estimulação elétrica. **Naturalia**, v. 1, p. 265, 1992.

GONÇALVES, Á.L.M.; LEMOS, M. ; NIERO, R. ; DE ANDRADE, S. F. ; MAISTRO, E. L. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Brassica oleracea L. var. acephala D.C. in different cells of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 740-745, 2012.

HAN, S, M.; LEE, G.G; PARK, K. K. Acute Dermal Toxicity Study of Bee Venom (*Apis mellifera* L.) in Rats. **Toxicol Res.**, v. 28, p. 99–102, 2012.

ITHARAT, A., HOUGHTON, P. J., ENO-AMOOQUAYE, E., BURKE, P. J., SAMPSON, J. H., RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p. 33-38, 2004.

- KHALIL, M.I., SULAIMAN, S.A. AND BOUKRAA, L. Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. **The Open Nutraceuticals Journal**, v.3, p.6-16, 2010.
- KIM, H. W.; KWON, Y. B.; HAM, T. W.; ROH, D. H.; YOON, S. Y.; LEE, H. J.; HAN, H. J.; YANG, I. S.; BEITZ, A. J.; LEE, J. H. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. **The Journal of veterinary medical science**, v. 65, n. 3, p. 349-355, 2003.
- KIM, J. I.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; HUH, Y.; CHO, I. H.; KANG, S.; KOH, H. K. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **The International Journal of Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 209-217, 2011a.
- KIM, S. N.; DOO, A. R.; PARK, J. Y.; BAE, H.; CHAE, Y.; SHIM, I.; LEE, H.; MOON, W.; LEE, H.; PARK, H. J. Acupuncture enhances the synaptic dopamine availability to improve motor function in a mouse model of Parkinson's disease. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27566, 2011b.
- LEANDRO, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. **An Acad Bras Cienc**, v. 87, n. 1, 2015.
- LEE, H., BAE, S.K., PYO, M., HEO, Y., KIM, C.G., KANG, C., KIM, E.. Antiwrinkle effect of PLA2-free bee venom against UVB-irradiated human skin cells. **J. Agr. Life Sci.**, v.49, n.1, p.125e135, 2015a.
- LEE, H., PYO, M.J., BAE, S.K., HEO, Y., KIM, C.G., KANG, C., KIM, E. Improved therapeutic profiles of PLA2-free bee venom prepared by ultrafiltration method. **Toxicol. Res.** v.31, n.1, p.33e40, 2015b.
- LEE, S. M.; YANG, E. J.; CHOI, S. M.; KIM, S. H.; BAEK, M. G.; JIANG, J. H. Effects of Bee Venom on Glutamate-Induced Toxicity in Neuronal and Glial Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID: 368196 p. 1-9, 2012. LIU, X.; CHEN, D.; XIE, L.; ZHANG, R. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 8, p. 1083–1089, 2002.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MIRAN J., et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.258, p.72–81, 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v.16, p. 55-63, 1983.
- NASCIMENTO, et al. Novos flavonoides de *Margaritopsis carrascoana* com atividade antioxidante. **Quim. Nova**, v.38, n.1, 2015.
- ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Rev**, v. 31, p. 173–194, 2012.

- PARK, M.H., CHOI, M.S., KWAK, D.H., OH, K.W., YOON, D.Y., HAN, S.B., SONG, H.S., SONG, M.J., HONG, J.T.. Anti-cancer effect of bee venom in prostate cancer cells through activation of caspase pathway via inactivation of NF- κ B. **Prostate**, v.61, 801–812, 2010b.
- PORTO, I.C.C.M., OLIVEIRA, D.C., RAELE, R.A., RIBAS, K.H.S., MONTES, M.A.J.R.; CASTRO, C.M.M.B. Cytotoxicity of current adhesive systems: In vitro testing on cell cultures of primary murine macrophages. **Dental Materials**, 27, 221-228, 2011.
- RATCLIFFE, N. A.; MELLO, C. B.; GARCIA, E. S.; BUTT, T. M.; AZAMBUJA, P. Insect natural products and processes: New treatments for human disease. **Insect Biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 10, p. 747-769, 2011.
- SCHALKA, Sérgio; et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. **An. Bras. Dermatol.** v.89, n.6, supl.1 Rio de Janeiro, Nov/Dez. 2014.
- SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO Jr., A.; ORSI, R. de O.; FERREIRA-JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptídes**, v. 31, n. 8, p. 1473-1479, 2010.
- SOBRAL, F., SAMPAIO, A., FALCÃO, S., QUEIROZ, M.J.R., CALHELHA, R.C., VILAS-BOAS, M., FERREIRA, I.C. Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. Food Chem. **Toxicol.** v.94, p.172e177, 2016.
- SUN, G. Y.; XU, J.; JENSEN, M. D.; SIMONYI, A. Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases. **Journal of Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 205-213, 2004.
- WANG, C., CHEN, T., ZHANG, N., YANG, M., LI, B., LÜ, X., CAO, X., LING, C.. Melittin, a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ kinase-NF κ B. **J. Biol. Chem.** 284, 3804–3813, 2009.
- YANG, E. J.; KIM, S. H.; YANG, S. C.; LEE, S. M.; CHOI, S. M. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 69-78, 2011.
- YOON, M-H.; LEE, D-W.; KIM, H-J.; CHUNG, J-Y.; DOO, A-R.; PARK, H-J.; KIM, S-N.; CHOE, B-Y. Investigation of the neuroprotective effects of bee-venom acupuncture in a mouse model of Parkinson's disease by using immunohistochemistry and In-vivo ¹H magnetic resonance spectroscopy at 9.4 T. **Journal of the Korean Physical Society**, v. 62, n. 2, p. 320-327, 2013.
- ZHANG, S.; LIU, Y.; YE, Y., WANG, X.R., LIN, L.; XIAO, L., ZHOU, P.; SHI, G.X., LIU, C. Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. **Toxicon**. v.148, p.64-73, 2018.
- ZHOU, J.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; SHEN, J.; QI, Y.; XUE, X.; LI, Y.; WU, L.; ZHANG, J.; CHEN, F.; CHEN, L. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder

from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 404, n. 2, p. 171-178, 2010.

CAPÍTULO II

7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICO E FOTOPROTETOR DA APITOXINA DA *Apis mellifera* DO SEMIÁRIDO DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL.

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC AND PHOTOPROTECTIVE
POTENTIAL OF APITOXIN BY *Apis mellifera* IN THE SEMIARID FROM RIO GRANDE
DO NORTE, BRAZIL

Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor da apitoxina da *Apis mellifera* do semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil

Geysa Almeida Viana, Carlos Ibere Alves Freitas, Victor Hugo V. Rodrigues, Déborah Munique Nogueira De Sousa, Wesley Adson Costa Coelho, José Gustavo Lima de Almeida, Jael S. Batista.

ABSTRACT.- Viana G.A., Freitas C.I.A., Rodrigues V.H.V., De Sousa D.M.N., Coelho W.A.C., De Almeida J.G.L. & Batista J.S. 2019. [Evaluation of the antioxidant, cytotoxic and photoprotective potential of apitoxin by *Apis mellifera* in the semiarid from Rio Grande do Norte, Brazil]. Avaliação da atividade antioxidante, citotóxica e fotoprotetora da apitoxina produzida por *Apis mellifera* do semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil. Journal of Apicultural Research 00(0):00-00. Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Av. Francisco Mota, Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. E-mail: geysaalmeidav@hotmail.com

ABSTRACT: This study aimed to evaluate the *in vitro* antioxidant and cytotoxic activity of apitoxin produced by *Apis mellifera* in Rio Grande do Norte semiarid, as well as the *in vivo* photoprotective activity of 2.5% and 5.0% apitoxin-based gel. The antioxidant activity of apitoxin was evaluated by the DPPH free radical photocolometric method and cytotoxicity by the MTT colorimetric method, employing L929 fibroblasts and HACAT keratinocytes. The photoprotective effect of the extract was evaluated in 16 Wistar rats distributed in four experimental groups with 4 rats in each: Group 1 (G1) composed of rats in which the skin of the dorsal region did not receive topical application of the apitoxin-based gel and was not subjected to UVB irradiation; Group 2 (G2) whose animals' skin was not subjected to topical gel application and irradiated and Group 3 (G3), whose skin was subjected to topical application of 2.5% apitoxin-based gel and irradiated and Group 4 (G4), in which the skin was subjected to topical application of 5.0% apitoxin-based gel and irradiated. The results show that the inhibitory capacity of apitoxin solution (IC₅₀) was 0.648 mg / mL. The highest percentages of DPPH inhibition were obtained at concentrations of 1mg / mL and 0.8mg / mL, which were respectively 74.92% and 60.85%. Apitoxin showed no cytotoxicity at concentrations of 2.5 µg.mL⁻¹ to 0.078125 µg.mL⁻¹, resulting in cell viability percentages of 86.99% to 99.17% for fibroblasts (L929) and 80.15% at 99, 89% for keratinocytes (HACAT). It was evidenced that the apitoxin-based gel was able to protect the skin from UVB irradiation, since the skin of G3 and G4 animals showed similar macroscopic and histological morphological pattern to G1, whereas in the skin of G2 rats were observed. on macroscopic examination focal areas of burn and erythema, and on histological examination keratinocyte necrosis, presence of inflammatory cells, mast cells, vascular congestion, interstitial edema and collagen fiber dissociation. The high evidenced antioxidant activity associated with the absence of cytotoxicity may justify the use of apitoxin in photoprotective cosmetic formulations.

INDEXING TERMS: Bee venom, northeastern Brazil, antioxidant activity, photoprotective potential *in vivo*.

RESUMO: Este estudo objetivou avaliar a atividade antioxidante e citotóxica *in vitro* da apitoxina produzida pela *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, além da atividade fotoprotetora *in vivo* do gel a base de apitoxina a 2.5% e 5.0%. A atividade antioxidante da apitoxina foi avaliada pelo método fotocolorimétrico do radical livre DPPH e a citotoxicidade através do método colorimétrico MTT, empregando fibroblastos da linhagem L929 e queratinócitos HACAT. O efeito fotoprotetor do extrato foi avaliado em 16 ratos Wistar distribuídos em quatro grupos experimentais com 4 ratos em cada: Grupo 1 (G1) composto por ratos no qual a pele da região dorsal não recebeu aplicação tópica do gel a base de apitoxina e não foi submetido à irradiação UVB; Grupo 2 (G2) cuja a pele dos animais não foram submetidos a aplicação tópica do gel e foram irradiados e o Grupo 3 (G3), cuja a pele foi submetidos a aplicação tópica do gel a base de apitoxina a 2.5% e submetido à irradiação e o Grupo 4 (G4), no qual a pele foi submetidos a aplicação tópica do gel a base de apitoxina a 5.0% e submetido à irradiação. Os resultados mostram que a capacidade inibitória da solução de apitoxina (IC50) foi de 0.648 mg/mL. Os maiores percentuais de inibição do DPPH foram obtidos nas concentrações de 1mg/mL e 0.8mg/mL, que foram respectivamente de 74.92% e 60.85%. A apitoxina não apresentou citotoxicidade em células normais nas concentrações de 2,5 µg.mL⁻¹ a 0.078125 µg.mL⁻¹, obtendo-se percentuais de viabilidade celular de 86.99% a 99.17% para fibroblastos (L929) e 80,15 % a 99,89 % para queratiócitos (HACAT). Foi evidenciado que o gel a base de apitoxina foi capaz de proteger a pele da irradiação UVB, uma vez que a pele dos animais dos G3 e G4 apresentaram padrão morfológico macroscópico e histológico semelhante ao G1, enquanto que na pele dos ratos do G2 foram observados no exame macroscópico áreas focais de queimadura e eritema, e no exame histológico necrose de queratinócitos, presença de células inflamatórias, mastócitos, congestão vascular, edema intersticial e dissociação das fibras colágenas. A alta atividade antioxidante evidenciada, associada à ausência citotoxicidade podem justificar o uso da apitoxina em formulações cosméticas fotoprotetora.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Veneno abelha, nordeste-Brasil, atividade antioxidante, Potencial fotoprotetor *in vivo*.

INTRODUÇÃO

Em todo mundo, recursos que possuam moléculas bioativas com potencial atividade terapêutica tem sido alvo de intensas investigações (BASTOS *et al.*, 2011). Os produtos oriundos da colmeia têm oferecido importantes contribuições para a civilização humana e para economia, e dentre os produtos apícolas, o veneno da abelha tem apresentado várias propriedades curativas (SCHALKA, 2014), sendo a terapia com seu uso utilizada na medicina tradicional oriental desde 1000 e 3000 ac (ZHANG *et al.*, 2018).

A apitoxina é produzida pelas abelhas para proteger a colônia contra a extensa variedade de predadores (ORSOLIC, 2011). É um líquido incolor (BAQER & YASEEN, 2018), sendo uma mistura complexa que possui vários peptídeos, enzimas, amins biologicamente ativas e

componentes não peptídicos, como histamina, dopamina e norepinefrina (SCIANI *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2010; AKHMEROVA *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015a,b)

Sua composição consiste de 88 % água, e os 12% restantes contém diversos componentes (LEANDRO *et al.*, 2015), podendo essa composição variar em função da idade, da sazonalidade e entre regiões geográficas. Dentre os componentes os que mais se destacam são a melitina e a fosfolipase A2, que representam juntas cerca de 75% do seu peso seco (SCIANI *et al.*, 2010; FERREIRA-JUNIOR *et al.*, 2010).

O Brasil se localiza geograficamente numa posição que proporciona uma maior intensidade de radiações solares (CABRAL *et al.*, 2011), onde a fração UVA (321-400) é a radiação que penetra profundamente na pele, atingindo a camada dérmica a qual está diretamente relacionada a lesões cutâneas e a alta incidência de câncer de pele tais como carcinoma e melanoma (BAILLO e LIMA 2012). Na epiderme e derme, os raios UVB promovem reações fotoquímicas e interações secundárias que geram radicais livres capazes de promover estresse oxidativo e consequentemente danos ao DNA, proteínas e membrana celular (ARIMON *et al.* 2015, ROMANHOLE *et al.*, 2016).

Diante disso, nas últimas décadas, os compostos derivados de fontes naturais, ganharam atenção considerável para uso em produtos de proteção solar, uma vez que a utilização de cosméticos naturais é uma tendência do mercado internacional. Isso aumenta a importância de se estudar uma ampla seleção de moléculas ativas em formulações de filtros solares (SAEWAN e JIMTAISONG, 2015).

Estratégias recentes de fotoproteção, incluíram a incorporação de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios naturais em protetores solares (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Tendo em vista a importância de se pesquisar o efeito fotoprotetor da apitoxina da *Apis mellifera* do semiárido do Rio Grande do Norte em formulações de filtros solares, desenvolveu-se este estudo buscando avaliar se substâncias bioativas que apresentam efeito fotoprotetor, capazes de atuarem como filtros solares e antioxidantes, que protegem a pele de lesões induzida experimentalmente pela irradiação UVB.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenções e preparo das amostras da Apitoxina

A amostra da apitoxina produzida pela abelha *Apis mellifera* foi coletadas junto à apicultores na zona rural do município de Maxaranguape, Rio Grande do Norte, Brasil, em julho de 2018. A coleta da apitoxina foi realizada segundo a técnica descrita por Gramacho,

Malaspina e Palma (1992), onde placas coletoras de vidro foram colocadas na entrada das colmeias e conectadas a um dispositivo que promove estimulação elétrica nas abelhas, que como forma de defesa, ferroaram a placa, liberando o veneno na forma líquida. Após secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40°C, durante 48 horas, o veneno foi raspado do vidro, pesado em balança analítica de precisão e em seguida preparada uma solução de 50 mg/mL utilizando-se água destilada como diluente. A solução pronta foi então armazenada em recipiente de vidro âmbar, envolvido em papel laminado e acondicionada em freezer (-20 °C) até o momento do uso.

Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH.

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Mensor *et al.* (2001). Para isso, a solução da apitoxina na concentração de 1mg/mL foi diluída gradativamente em metanol, resultando em diferentes concentrações (1; 0.8; 0.6; 0.4; 0.2 e 0.1mg/mL). 1ml de cada concentração foi posta em tubos de ensaio juntamente com 1.5ml de uma solução metanólica de DPPH 60µmol.L-1. Após 15 minutos foi medida a absorbância das amostras em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517nm, tendo como branco somente o metanol. A porcentagem de inibição referente a cada concentração da solução da apitoxina foi obtida a partir da relação da absorbância do mesmo com a absorbância de uma solução contendo 1ml de metanol e 1.5ml da solução de DPPH. A capacidade de inibir o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{A \text{ controle (-)} - A \text{ amostra}}{A \text{ controle (-)}} \times 100$$

Foi construída a curva padrão de DPPH plotando-se o valor médio das absorbâncias obtidas pelas concentrações da solução. Após a obtenção dos valores percentuais de inibição do radical livre, os mesmos foram analisados em Software Oringin 7.0 com a finalidade de se obter um gráfico que apresentasse valores pelo quais seria calculada a concentração inibitória de 50% do radical DPPH (IC50), que seria a concentração da amostra necessária para consumir 50% do DPPH.

Avaliação da atividade citotóxica da solução de apitoxina

Foi avaliada a atividade citotóxica da solução de apitoxina através do ensaio de citotoxicidade em linhagem de fibroblastos (L929) e queratinócitos (HACAT) pelo teste MTT (brometo de 3- (4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), um ensaio quantitativo *in vitro*, que estima a viabilidade celular, segundo metodologia proposta por Mosman (1983). As células da linhagens L929 e HACAT foram semeadas em placas de cultivo de 96 poços e a seguir expostas a concentração inicial de 2,5 µg.mL⁻¹, seguindo em diluições seriadas, em um fator 2, totalizando seis diluições. As placas foram incubadas por 72 h, com 5 % de CO₂ e a 37 °C. Posteriormente, foi realizada a adição de 10 µL do reagente MTT na concentração de 5 mg.mL⁻¹ em todos os poços da placa, sendo a placa novamente incubada por 4 horas com 5% de CO₂ a 37°C.

Para a quantificação do sal reduzido a formazan pelas células vivas, as absorbâncias das soluções resultantes foram medidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm. Os valores médios das densidades ópticas obtidas foram então comparadas com as médias obtidas pelo controle negativo (solvente da amostra - água destilada), considerada como correspondente a 100% de viabilidade celular.

Avaliação do Potencial fotoprotetor

Desenvolvimento do gel fotoprotetor à base de apitoxina

Foi realizado o desenvolvimento da formulação fotoprotetora para uso tópico na forma de gel hidroxietilcelulose de alta viscosidade. A composição do gel consistiu de hidroxietilcelulose 2,5g, sorbitol 3g; água purificada q.s.p 100g; edetato dissódico 0,1g; solução conservante de parabenos 3,3g e solução conservante de imidazolidinilureia 0,6g. Para cada 10g do gel foram adicionados 5.0% e 2.5% de apitoxina, a serem utilizadas nos ensaios de fotoproteção.

Cálculo do fator de proteção solar (FPS) dos cremes fotoprotetores.

Foi determinado o FPS *in vitro* do gel a base de apitoxina, conforme preconizado por Mansur *et al.* (1986). Para tanto, os géis fotoprotetores foram diluídos em etanol absoluto na concentração de 0.2 mg/mL. Essas soluções foram então submetidas à leitura em espectrofotômetro, para a determinação das absorbâncias na faixa de comprimento de onda de 290 a 320 nm. Para o cálculo do FPS foi utilizada a expressão matemática que relaciona o efeito eritematogênico e a intensidade da luz de cada comprimento de onda ($EE \times I$).

Para o cálculo do FPS foi aplicada a fórmula:

$$\text{FPS} = \text{FC} \cdot \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \cdot \text{I}(\lambda) \cdot 2 \cdot \text{Abs}(\lambda)$$

onde:

FC = Fator de correção (10);

EE (λ) = efeito erimatogênico da radiação em cada comprimento de onda λ ;

I (λ) = intensidade da radiação solar em cada λ ;

Abs = Absorvância em cada λ .

Atividade fotoprotetora in vivo

Foram utilizados 16 *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), linhagem Wistar, machos, com 60 dias de idade pesando aproximadamente 200g. Durante o período experimental, todos os animais permaneceram no Biotério, alojados em caixas de polipropileno (2 animais por caixa) forradas com maravalha, sob controle de temperatura (21 a 23°C), fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, recebendo ração comercial (Purina®) e água *ad libitum*. Segundo o fabricante, a ração apresenta 23% de proteína bruta, 4% de lipídios totais, 5% de fibra e 12% de minerais. O protocolo experimental foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte (UERN), com número de protocolo 004/18.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo que o grupo I (G1) foi composto por quatro ratos no qual a região dorsal não recebeu aplicação tópica do gel com apitoxina e não foi submetido à irradiação UVB (controle negativo); grupo II (G2), com o mesmo número de animais que não foram submetidos a aplicação tópica do gel com apitoxina e foram irradiados (controle positivo); o grupo III (G3), também com o mesmo número de animais, os quais foram submetidos a aplicação tópica de 0.5g do gel com apitoxina na concentração de 2.5% e foram irradiados; e grupo IV (G4), submetidos a aplicação tópica de 0.5g do gel com apitoxina na concentração de 5% que também foram irradiados.

Irradiação da pele dos ratos

Os animais foram anestesiados com anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (8.0 mg/kg) e cloridrato de quetamina (140 mg/kg), administrado por via intraperitoneal. Após anestesia, foi realizada a tricotomia na pele da região dorsolombar, com

auxílio de lâmina de um tricótmio, perfazendo uma área quadrada de 25cm². Uma hora antes do início da irradiação, no dorso tricotomizado dos animais do G3, foi realizada aplicação tópica de 0.5g do gel com apitoxina, conforme metodologia descrita por Figueiredo et al. (2014). O gel concentrado foi aplicado com auxílio de espátulas de madeiras estéreis e individuais, formando uma película contendo 2.0 mg/cm², que cobria toda a superfície da pele tricotomizada.

O modelo de irradiação UVB foi realizado como descrito anteriormente por Batista et al. (2018). Nesse modelo, a irradiação da pele dos ratos foi realizada através da utilização de uma lâmpada ultravioleta UVB, modelo Osram ULTRA-VITALUX, que emite radiação na faixa de 315-400nm. A lâmpada foi localizada a uma distância de 20 cm acima da área a ser irradiada. Ao atingirem o plano anestésico, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma prancha de madeira e suas regiões dorsais ficaram diretamente exposta a radiação UVB por um período de 1 hora.

Exame macroscópico

Após 6h (seis horas) do término da irradiação, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sob anestesia profunda. A região dorsal de cada animal foi avaliada macroscopicamente, através da avaliação visual, de modo a permitir a identificação de possíveis alterações, sendo considerada presença de bolhas, coloração, brilho, opacidade da pele, além de maciez e hidratação. A intensidade das referidas alterações foram classificadas em ausente (0), discreta (+), moderada (++) e intensa (+++).

Exame histológico

A área da pele da região dorsal de cada animal foi incidida com lâmina de bisturi n. 15, divulsionada e separada da tela subcutânea com tesoura com o auxílio de uma pinça de dissecação. A seguir, fragmentos da pele foram fixados em solução tamponada de formol a 10% e processados de forma rotineira para histologia, incluídos em parafina, cortados a 5µ de espessura, corados pela hematoxilina-eosina (HE), pelo tricômico de Masson para avaliação de fibras colágenas e com Azul de Toluidina para avaliação dos mastócitos. Realizou-se então análise histológica descritiva das alterações cutâneas sendo avaliados os seguintes parâmetros histológicos: presença de células inflamatórias, mastócitos, células necrosadas e fibras colágenas. Os referidos parâmetros histológicos foram agrupados em ausente, leve, moderado ou intenso, seguindo os critérios descritos por Akkol *et al.* (2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antioxidante

O gráfico obtido pelos percentuais de inibição da solução de apitoxina nas diferentes concentrações demonstrou padrão linear, ou seja, quanto maior a concentração da solução, maior foi o consumo de DPPH e menor foram as absorbâncias (Figura 1). Os resultados mostram que a capacidade inibitória da solução de apitoxina (IC₅₀) foi de 0.648 mg/mL. Sendo assim, quando comparado ao antioxidante padrão ácido ascórbico (IC₅₀=0,255 mg/mL), substância de referência frequentemente utilizado nas análises de atividade antioxidante pela capacidade de reduzir rapidamente o DPPH, podemos considerar que a apitoxina apresentou boa atividade antioxidante. Os maiores percentuais de inibição do DPPH foram obtidos nas concentrações de 1mg/mL e 0.8mg/mL, que foram respectivamente de 74.92% e 60.85%.

Sabe-se que a atividade antioxidante é atribuída à capacidade de eliminar as espécies reativas de oxigênio/radicais livres por doação de hidrogênio (DAVID e ALVES, *et al.* 2010; HASSANEIN e HEGAB, 2010). A capacidade sequestrante do radical DPPH pode ser representada pelos valores da IC₅₀ (%) das amostras comparadas ao ácido ascórbico, usada como padrão de referência (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Vale lembrar que quanto menor o valor da IC₅₀ (%), maior a capacidade sequestrante do radical e, portanto, maior a atividade antioxidante (CAMPOS, *et al.*, 2012).

Embora existam muitos estudos disponíveis na literatura nacional relacionados à avaliação da atividade antioxidante em ensaio de sequestro do radical DPPH de produtos apícolas tais como própolis, pólen e mel (FROZZA *et al.*, 2013; KHALIL *et al.*, 2010; ALIČIĆ *et al.*, 2014), o mesmo não ocorre com a apitoxina. No entanto, a literatura internacional contempla artigos nos quais confirmam o grande potencial antioxidante do veneno produzido por abelhas do gênero *Apis*.

Sobral *et al.* (2016) obtiveram IC₅₀ = 0.225 mg/mL em amostras do veneno produzido pela *Apis mellifera iberiensis* do Nordeste de Portugal. Mokosuli *et al.*, 2013 ao avaliar a bioatividade de amostras de veneno de abelhas no Norte da Ilha de Sulawesi, Indonésia, demonstraram que 500 ppm de veneno de *Apis nigrocinta* foi capaz de inibir a oxidação de ácido linoleico em 75.10%, enquanto que o veneno produzido por *A. Dorsais* em uma concentração de 200 ppm foi capaz de inibir em 80.78%.

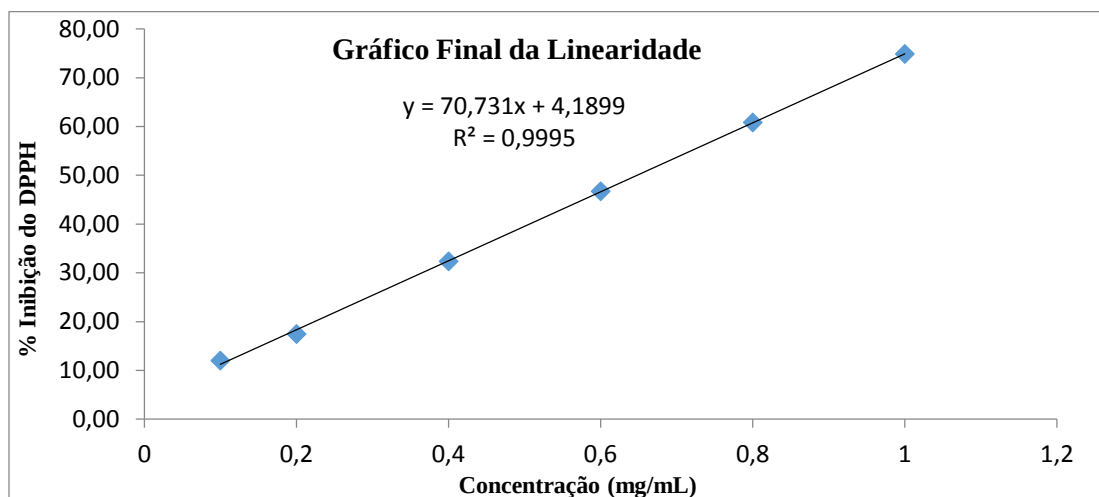


Figura 1. Equação da reta, em função da concentração da solução de apitoxina com suas respectivas absorbâncias.

Atividade citotóxica

Foi avaliada a atividade citotóxica da solução de apitoxina, em fibroblastos (L929) e queratinócitos (HACAT) por meio do teste MTT, desenvolvido por Mosmann (1983), que estima a taxa de sobrevivência celular após exposição à substância teste. A citotoxicidade é o potencial de determinada substância em promover alteração metabólica em cultura de células, possibilitando culminar ou não em morte celular (AWALE *et al.*, 2008). O teste MTT é definido na literatura como um método *in vitro* apropriado para estimar a citotoxicidade, cujo o princípio do método baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tretazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada em cristais de formazan que são de cor púrpura.

No presente estudo, verificou-se que as médias da viabilidade celular variaram de acordo com as concentrações testadas, obtendo-se valores de 86.99% a 99.17% para fibroblastos (L929) e 80,15 % a 99,89 % para queratiócitos (HACAT). Além disso, observou-se que, com exceção da concentração de 0,078125 µg/mL, a viabilidade celular da linhagem L929 obteve maior percentual que da linhagem HACAT, quando expostas à mesma concentração da solução de apitoxina (Figura 2). Diante do exposto, constatamos que a solução de apitoxina não exerceu efeito citotóxico sobre as duas linhagens testadas, uma vez que as médias da viabilidade celular das diferentes concentrações da solução de apitoxina apresentaram percentuais satisfatórios, o que indica segurança no seu uso.

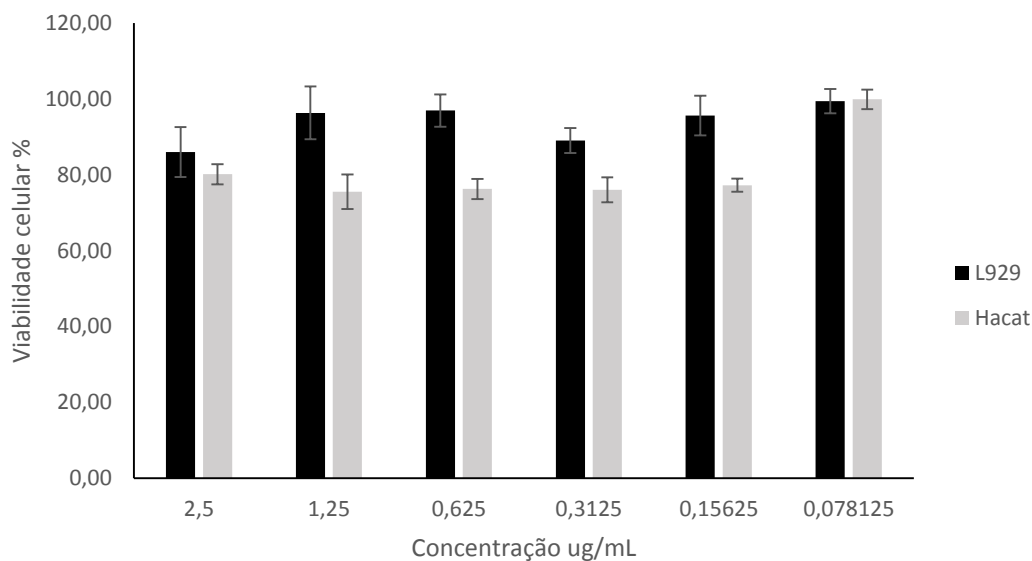


Figura 2. Efeito da apitoxina na viabilidade das células normais L929 (Fibroblastos murino) e HACAT (Queratinócitos), sob diferentes concentrações (µg/mL), após 72 horas de incubação.

Os fibroblastos sintetizam os componentes da matriz extracelular, como: as fibras colágenas, as fibras reticulares, as fibras elásticas e a substância fundamental, além disso produzem fatores de crescimento que controlam a proliferação e a diferenciação celular (JUNQUEIRA, 2013). Já os queratinócitos representam 80% das células epidérmicas, cuja principal função é a síntese de queratina, que constitui uma camada protetora da epiderme (SAMUELSON, DON A., 2007). Portanto, estudar sobre o destino dessas células é abrir possibilidades para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento de doenças de pele, entre elas o câncer, assim como para o desenvolvimento de cosméticos (DA SILVA, *et al*, 2013).

Atividade fotoprotetora

Na avaliação macroscópica foi possível constatar que dos G1, G3 e G4 apresentaram pele com aspecto morfológico dentro da normalidade observada para a espécie, sem evidências de alterações do aspecto, coloração e consistência. Enquanto que todos os animais do G2 apresentaram lesões cutâneas caracterizadas pela presença de áreas focais de queimadura e eritema, aspectos aspecto desidratado, superfície rugosa e áspera (Figura 9). Na análise histológica verificou-se que a pele dos animais pertencentes ao G1, G3 e G4 não apresentaram alterações, demonstrando aspecto histológico normal. Na pele dos animais do G2 foi possível constatar necrose de queratinócitos, presença de moderada quantidade de células inflamatórias

polimorfonucleares, mastócitos, além de congestão vascular, edema intersticial e dissociação das fibras colágenas (Figura 10).

O veneno produzido pela abelha *Apis melífera* do semiárido do Brasil ainda não havia sido avaliado quanto à atividade fotoprotetora. A eficácia dos protetores solares é dependente da sua capacidade de absorver, refletir e/ou dispersar a radiação ultravioleta evitando seus danos (MELO e SIQUEIRA, 2012), sendo capaz de proteger a pele de eritemas e edemas, reduzindo o risco de queimaduras, de carcinoma de células da camada basal e espinhosa (TOYOSHIMA *et al.*, 2004).

Segundo Pinho *et al.* (2014), o Fator de Proteção Solar (FPS) é o principal dado para quantificação da eficácia fotoprotetora de um filtro solar, sendo universalmente aceito. O fator de proteção solar do gel a base de apitoxina foi determinado *in vitro* pelo método Mansur (1986), cujos resultados dessas análises demonstraram que os FPS obtidos para o gel a base de apitoxina a 2.5% e a 5.0%, foi de 0.2 para ambas as concentrações, o que demonstra que os géis apresentaram baixos fatores de proteção solar. Após a coleta e secagem em estufa, o veneno da abelha do presente estudo apresentou cor branco amarelado e quando diluído resultou em uma solução transparente. Assim, os baixos FPS observados poderiam ser justificados pela transparência da solução após diluição do gel em álcool etanol absoluto, uma vez que soluções transparentes resultam em baixa absorbância.

Na avaliação *in vivo*, ficou evidente que os géis a base de apitoxina do presente estudo foi capaz de proteger a pele irradiada com uma lâmpada ultravioleta UVB, que emitia radiação na faixa de 315-400nm, uma vez que a pele submetida à aplicação tópica do gel a base de apitoxina a 2.5% e 5.0% e à irradiação UVB, apresentou aspecto morfológico dentro da normalidade, sem evidências de alterações. Enquanto a pele submetidas à irradiação UVB e não tratada com aplicação tópica do gel, foram constadas evidentes alterações provocada pela irradiação tais como eritema e presença de bolhas. Dessa forma, fica evidente o potencial da apitoxina como produto natural promissor para o desenvolvimento de novos cosméticos com eficácia fotoquimioprotetora.

Uma vez que os géis a base de apitoxina a 2.5% e a 5.0% apresentaram baixos FPS, não constituindo, portanto barreira eficaz à radiação UV, o efeito fotoprotetor da apitoxina poderia estar associado à sua atividade antioxidante, tal como demonstrado pelo método DPPH. Na epiderme e derme, os raios UVB são absorvidos por cromóforos celulares que promovem reações fotoquímicas e interações secundárias que geram radicais livres, como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, dentre outros, capazes de promover estresse oxidativo e consequentemente danos ao DNA, proteínas e membrana celular (ARIMON *et al.* 2015,

ROMANHOLE *et al.*, 2016). Como os antioxidantes tem a capacidade de bloquear os efeitos deletérios dos radicais livres, o efeito fotoprotetor constatado em nossa pesquisa pode então estar associado à propriedade antioxidante apresentada pela apitoxina testada.

Além disso, alguns compostos presentes no veneno da abelha, tais como a melitina, podem agir como agentes anti-inflamatórios (ORSOLIC, 2011; YANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2010). A inflamação por queimadura solar é a resposta aguda mais facilmente observada na pele submetida à radiação UV, ocasionando aumento da temperatura cutânea e eritema (CLAVEAU; ROSSI, 2016). Através da avaliação histológica da pele é possível sugerir que a apitoxina também exerceu efeito anti-inflamatório, tendo em vista que na pele dos animais submetidos à irradiação UVB e não tratada com aplicação tópica do gel, foram constadas presença de células inflamatórias polimorfonucleares, mastócitos, além de congestão vascular e edema intersticial, padrão histológico este não evidenciado na pele dos ratos submetidos à aplicação tópica do gel a base de apitoxina a 2.5% e a 5.0%, os quais apresentaram pele com aspecto histológico semelhante à pele não irradiada, utilizada como controle negativo.

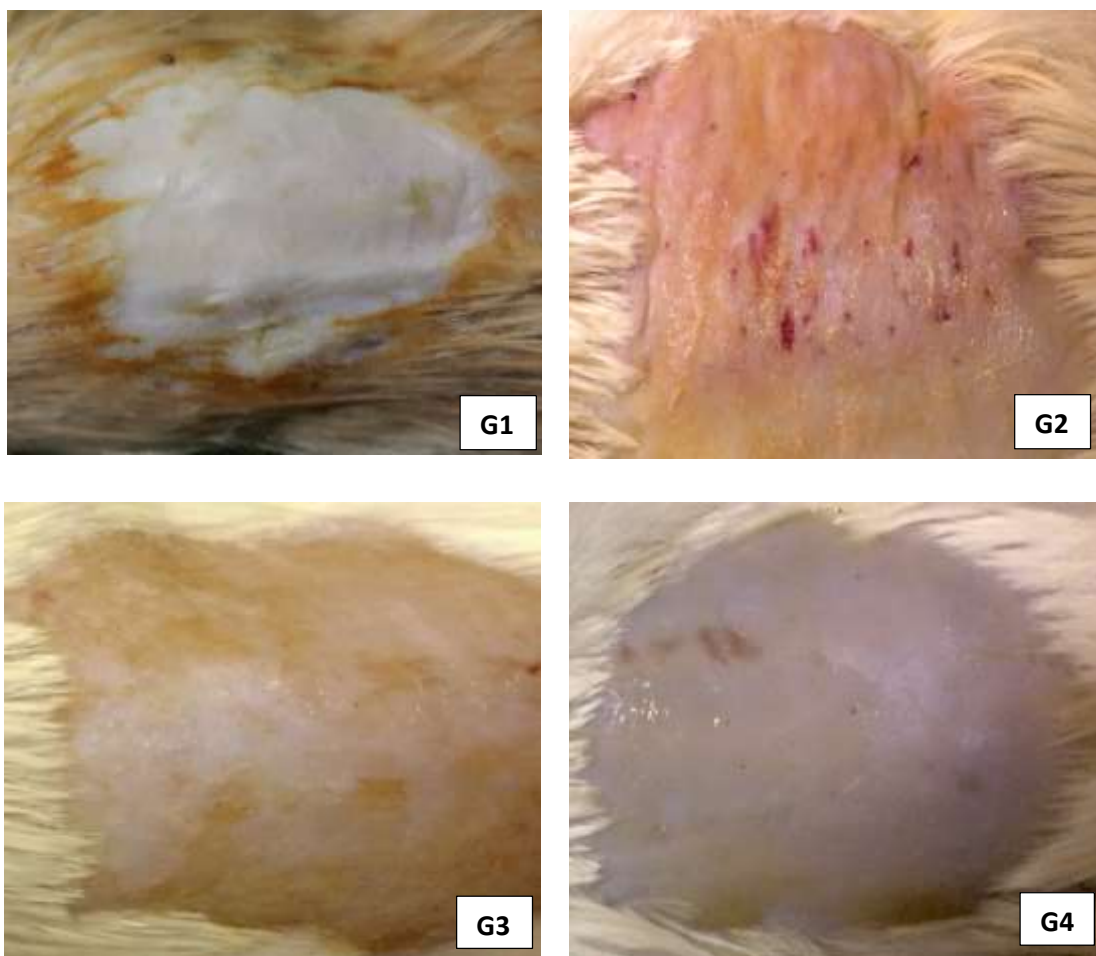


Figura 3. Aspecto macroscópico da pele de *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, linhagem Wistar, nos grupos experimentais. Pele não tratada com gel fotoprotetor e

não submetido à irradiação UVB (G1), pele submetida à irradiação UVB e não tratada com gel fotoprotetor (G2), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 2,5% e à irradiação UVB (G3), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 5% e à irradiação UVB (G4). Nota-se no G1 pele com aspecto normal. No G2 pele com áreas focais de queimadura e eritema. No G3 e G4 ausência de alterações.

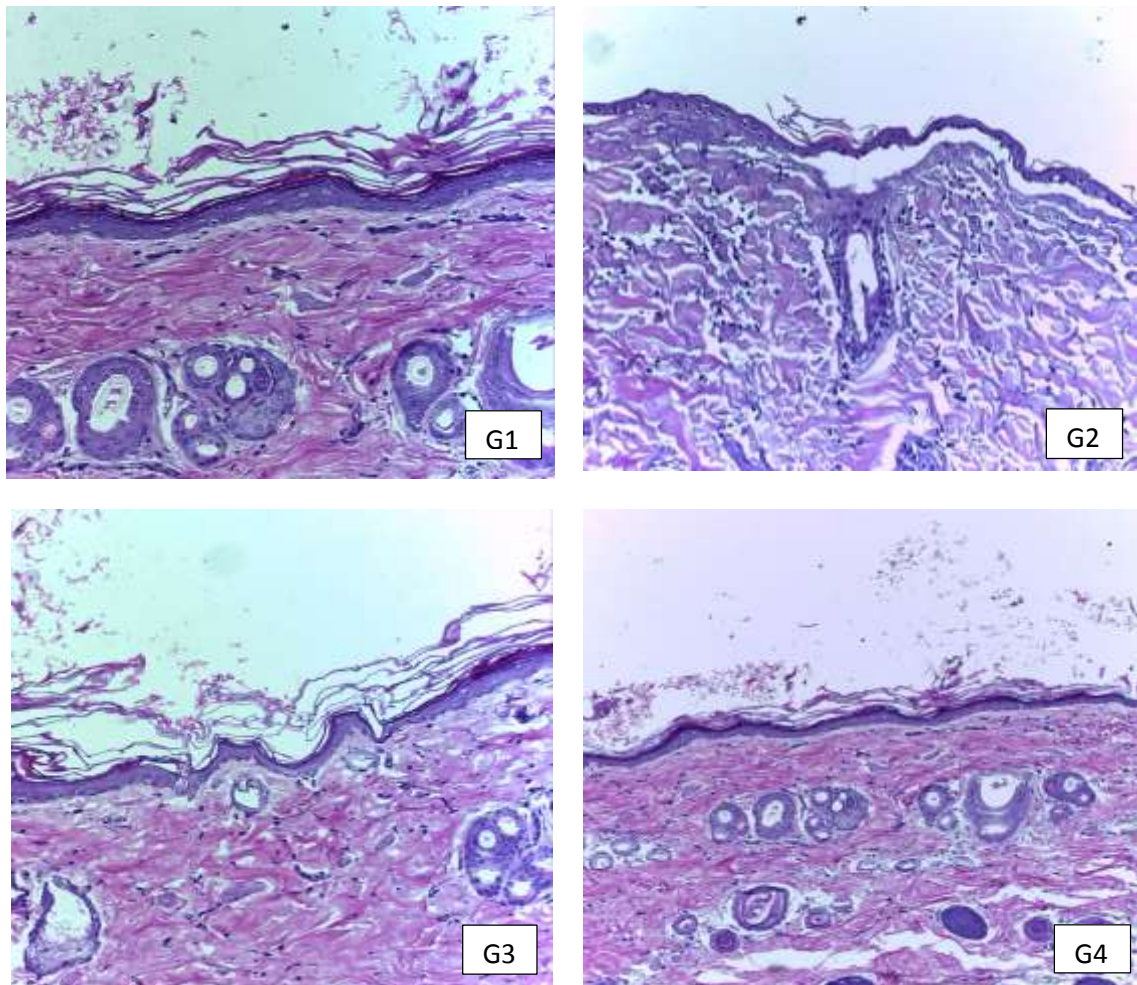


Figura 4. Fotomicrografias da pele de ratos Wistar corados com hematoxilina e eosina, nos diferentes grupos experimentais. Pele não irradiada e não tratada com gel com apitoxina (G1), pele submetida à irradiação UVB e não tratada com gel fotoprotetor (G2), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 2,5% e à irradiação UVB (G3), pele submetida à aplicação tópica de gel fotoprotetor com apitoxina a 5% e à irradiação UVB (G4). Nota-se no G1, G3 e G4 pele com aspectos histológico normal. Em G2, nota-se presença de bolhas subepidérmica, além de células necróticas, edema intersticial e dissociação das fibras colágenas. Obj. 20x. Barra de escala = 200µm.

CONCLUSÕES

A apitoxina produzida por *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil apresentou *in vitro* alta capacidade antioxidante e não apresentou citotoxicidade em fibroblastos (L929) e queratinócitos (HACAT). *In vivo*, o gel a base de apitoxina a 2.5% e a 5.0% exerceram efeito fotoprotetor. Portanto, a alta atividade antioxidante evidenciada, associada à ausência citotoxicidade, podem justificar o uso da apitoxina em formulações cosméticas fotoprotetora.

REFERÊNCIAS

- AKHMEROVA, D.I., STAVRIANIDI, A.N., RODIN, I.A., SHPIGUN, O.A.. Application of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for detection of melittin, a characteristic peptide of bee venom. **Inorg. Mater.** v.51, n.14, p.1431e1437, 2015.
- AKKOL, E. K., GÖGER, F., KOŞAR, M., & BAŞER, K. H. C. Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. **Food Chemistry**, v.108, n.3, p.942-949, 2008.
- ALIČIĆ, D.; ŠUBARIĆ, D.; JAŠIĆ, M.; PAŠALIĆ, H.; AČKAR, Đ. Antioxidant properties of pollen. **Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku**, v.3, n.1, p.6-12, 2014.
- ALMEIDA, W.A., et al. Photoprotective activity and increase of SPF. In sunscreen formulation using lyophilized red propolis extracts from Alagoas. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, 2019.
- ALVES CQ, BRANDÃO HN, DAVID JM, DAVID JP, LIMA LS. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC**, v.5, n.12, p. 7- 8, 2007.
- ARIMON, M.; TAKEDA, S.; POST, K.L.; SVIRSKY, S.; HYMAN, B. T.; BEREZOVSKA, O. Oxidative stress and lipid peroxidation are upstream of amyloid pathology. **Neurobiology of disease**, v.84, p.109-119, 2015.
- AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medical Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 181-9, 2008.
- BAILLO, V.P. & LIMA, A.C. Nanotecnologia aplicada à fotoproteção. *Rev. Bras. Farm.*, v.93, n.3, p. 271-278, 2012
- BAQER, L.K. & YASEEN, R.T. The Effect of Whole Honey Bee Venom (*Apismellifera*) on Reducing Skin Infection of Rabbits Caused by Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: An In vivo Study. **J Pure Appl Microbiol**, v.12, n.4, p.2111-2116, 2018.BASTOS,

E. M. A. et al. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255-1259, 2011.

BATISTA, C.M.; ALVES, A.V.F. ; QUEIROZ, L.A. ; LIMA, B.S. ; FILHO, R.N.P. ; ARAÚJO, A.A.S. ; DE ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C. ; CARDOSO, J.C. . The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. **Journal of photochemistry and photobiology b-biology** , v. 180, p. 198-207, 2018.

CABRAL, L. D. S., PEREIRA, S. O. Filtros solares e fotoprotetores mais utilizados nas formulações no Brasil. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, v.4, n.3, Pub.4, Julho 2011.

CAMPOS, R.P., et al. Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.) **Rev. Bras. Frutic.**, v. 34, n. 1, 2012.

ALVES, C.Q. & DAVID, J.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 3, n.3, 10, p.2202-2210, 2010.

DA SILVA, R.A.; ZAMBUZZI, W. F.; RIBEIRO M. M.; DE SOUZA, A. C. S. Queratinócitos e seus desafios: uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares. **Saúde rev.**, v. 13, n. 35, p. 3-14, 2013.

DESOUZA, K.C.B.; BASSANI, V.L. LC- Determination of flavonóides: Separation of quercetin, luteonin and 3-o-methyl quercetil in *Achyrocline satureoides* preparation. **J. Pharm. and Biom. Anal.**, 28, 771-7, 2002.

FERREIRA-JUNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JUNIOR, A. L.; ORSI, R. de O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon**, v.56, n. 3, p. 355-362, 2010.

FROZZA C.O., GARCIA C.S., GAMBATO G., SOUZA M.D., SALVADOR M., MOURA S., PADILHA F.F., SEIXAS F.K., COLLARES T., BORSUK S., DELLAGOSTIN O.A., HENRIQUES J.A. & ROESCH-ELY M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food. Chem. Toxicol.** V.52, p.137-142, 2013.

GRAEFE, E.U., DERENDORF, H.; VEIT, M. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. **Int J Clin Pharmacol Ther**, v.37, n.5, 219-33, 1999.

GRAMACHO, K. P.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Avaliação da produtividade de veneno em abelhas africanizadas pela utilização da técnica de coleta por estimulação elétrica. **Naturalia**, v. 1, p. 265, 1992.

HASSANEIN N.M.A.; HEGAB, A.M. Bee venom - lead acetate toxicity interaction. **Aust. J. Basic. Appl. Sci**, 4, 2206-2221, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica: texto e atlas. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 90. Saúde em Revista Queratinócitos e seus desafios: uma revisão da literatura sobre mecanismos intracelulares

KHALIL, M.I., SULAIMAN, S.A. AND BOUKRAA, L. Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. **The Open Nutraceuticals Journal**, v.3, p.6-16, 2010

LEANDRO, et al. Antimicrobial activity of apitoxin, melittin and phospholipase A2 of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. **An Acad Bras Cienc**, v. 87, n. 1, 2015.

LEE, H., BAE, S.K., PYO, M., HEO, Y., KIM, C.G., KANG, C., KIM, E.. Antiwrinkle effect of PLA2-free bee venom against UVB-irradiated human skin cells. **J. Agr. Life Sci.**, v.49, n.1, p.125e135, 2015a.

LEE, H., PYO, M.J., BAE, S.K., HEO, Y., KIM, C.G., KANG, C., KIM, E. Improved therapeutic profiles of PLA2-free bee venom prepared by ultrafiltration method. **Toxicol. Res.** v.31, n.1, p.33e40, 2015b.

MANSUR, J. de S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. D'; AZULAY, R. David. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 61, n. 3, p.121-124, maio/jun. 1986.

MELO, M.R.; SIQUEIRA, A.P.N.D.F. Desenvolvimento de uma loção fotoprotetora, avaliação da estabilidade e determinação in vitro do FPS. **Perquirere**, v.9, n.1, p.81-97, 2012.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MOKOSULI, Y. et al. Pharmacological Bioactivity Honey Bee Venom *Apis Nigrocincta* Smith and *Apis Dorsata* Binghami Endemic to North Sulawesi. **International Journal of Science and Engineering Investigations**, v. 2, n.18, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods**, v.16, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, et al. Novos flavonoides de *Margaritopsis carrascoana* com atividade antioxidante. **Quim. Nova**, v.38, n.1, 2015.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 31, n. 1-2, p. 173-194, 2011.

PINHO, J.J.R.G. et al. Determinação do fator de proteção solar (in vitro) de produtos magistrais na forma de gel - avaliação dos aspectos sensoriais e físico-químicos. **HU Revista, Juiz de Fora**, v. 40, n. 1 e 2, p.79-86, 2014.

ROMANHOLE, R.C.;ATAIDE, J.A.; CEFALI, L.C.; MORIEL, P.; MAZZOLA, P.G. Photostability study of comercial sunscreens submitted to artificial UV irradiation and/or fluorescent radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.162, p.45-49, 2016.

SAEWAN, N. AND JIMTAISON, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** v. 3 , n.9, p. 129-141, 2013.

SCHALKA, Sérgio; et al. Brazilian Consensus on Photoprotection. **An. Bras. Dermatol.** v.89, n.6, p.1-74, 2014.

SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; LOURENÇO Jr., A.; ORSI, R. de O.; FERREIRA- JUNIOR, R. S.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Identification of a novel melittin isoform from Africanized *Apis mellifera* venom. **Peptídes**, v. 31, n. 8, p. 1473-1479, 2010.

SOBRAL, F., SAMPAIO, A., FALCÃO, S., QUEIROZ, M.J.R., CALHELHA, R.C., VILAS-BOAS, M., FERREIRA, I.C. Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. **Food Chem. Toxicol.** v.94, p.172e177, 2016.

TOYOSHIMA, M.; HOSODA, K.; HANAMURA, M.; OKAMOTO, K.; KOBAYASHI, H.; NEGISHI T. Alternative methods to evaluate the protective ability of sunscreen against photogenotoxicity. **J Photochem Photobiol B** ,v.73, p.59-66,2004.

YANG, E. J.; KIM, S. H.; YANG, S. C.; LEE, S. M.; CHOI, S. M. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 69-78, 2011

ZHANG,S.; LIU, Y.; YE,,Y., WANG,X.R., LIN,L.; XIAO, L., ZHOU, P.; SHI, G.X., LIU, C. Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications. **Toxicon**. v.148, p.64-73, 2018.

ZHOU, J.; ZHAO, J.; ZHANG, S.; SHEN, J.; QI, Y.; XUE, X.; LI, Y.; WU, L.; ZHANG, J.; CHEN, F.; CHEN, L. Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 404, n. 2, p. 171-178, 2010.

9. CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos, sob as condições experimentais empregadas no presente estudo, podemos concluir:

- A apitoxina produzida por *Apis mellifera* no semiárido do Rio Grande do Norte apresentou alta capacidade antioxidante *in vitro* e não exerceu efeito genotóxico, exceto na concentração de 50 µg/mL, além de promover efeito antígeno-tóxico.
- Foi constatado o potencial antineoplásico *in vitro* frente a linhagens de células tumorais PC3, HEPGE2, MAD-MB435 e SNB19, não sendo observada citotoxicidade em células normais (L929 e HACAT), o que sugere uma ação seletiva contra células neoplásicas.
- O gel formulado a base de apitoxina a 2.5% e a 5.0% exerceu efeito fotoprotetor *in vivo* na pele de ratos Wistar submetidos a aplicação tópica.
- A alta atividade antioxidante evidenciada, associada à ausência genotoxidade e citotoxicidade podem justificar o uso da apitoxina em formulações cosméticas fotoprotetora.