

RESUMO EXPANDIDO - PRODUTOS NATURAIS E BIOATIVOS DE
INTERESSE FARMACOLÓGICO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA
PRÓPOLIS MARROM DE ABELHA APIS MELLIFERA DE ANAJATUBA-MA:
UMA ABORDAGEM IN VITRO**

Jayane Sousa Santos (jayane.sousa@discente.ufma.br)

Marcos Farias Carneiro (marcos.fc@discente.ufma.br)

Ana Clara Ramos Barros (ana.crb@discente.ufma.br)

Tatielle Gomes Dias (tatielle.dias@discente.ufma.br)

Richard Pereira Dutra (richard.dutra@ufma.br)

Aramys Silva Dos Reis (aramys.reis@ufma.br)

Márcia Cristina Gonçalves Maciel (macielmcg@gmail.com)

INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica essencial desencadeada frente a infecções ou danos teciduais, atuando como mecanismo de defesa do organismo (Man et al., 2022). Entretanto, sua desregulação está associada à fisiopatologia de diversas doenças crônicas e inflamatórias, como diabetes mellitus, obesidade, artrite reumatoide, doenças cardiovasculares e câncer, que

envolvem processos inflamatórios e estresse oxidativo que podem causar danos celulares, frequentemente agravados pela produção excessiva de óxido nítrico (NO) (Bueno-Silva, 2015).

Nesse contexto, a própolis tem despertado interesse devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, atribuídas principalmente à presença de flavonoides e compostos fenólicos (Dutra et al., 2023). Entretanto, ainda existem lacunas sobre estudos de própolis marrom oriunda do Maranhão, uma vez que variações na flora e nas condições climáticas podem influenciar sua composição química e sua atividade biológica (Garbis et al., 2024).

OBJETIVO

Avaliar o potencial citotóxico e anti-inflamatório da própolis marrom produzida por *Apis mellifera* em Anajatuba, Maranhão, por meio de ensaios *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de própolis foram coletadas em apiários de Anajatuba, Maranhão, higienizadas manualmente e armazenadas sob refrigeração, logo após foi feito o preparo do extrato hidroetanólico na proporção de 1:10 de acordo com a metodologia de Dutra et al., 2023 com adaptações.

A citotoxicidade da própolis marrom foi avaliada em macrófagos murinos RAW 264.7 cultivados em placas de 96 poços. Foram testadas três amostras do extrato hidroetanólicos da própolis marrom (A1, A2 e A3) que foram coletadas de locais diferentes da região de Anajatuba. O produto natural foi previamente centrifugado, filtrado e submetido a diluições seriadas de 1:2 em meio DMEM, a partir da concentração de 50 µg/ml até 3,12 µg/ml. Após incubação por 24 horas, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT com leitura da absorbância em espectrofotômetro a 550 nm (Biotek Elx800, Winooski, VT, EUA).

O potencial anti-inflamatório do extrato foi avaliado em macrófagos da linhagem RAW 264.7 estimulados com 1 µg/mL de lipopolissacarídeo, para induzir a resposta inflamatória celular. Foi feita a diluição seriada (1:2) na concentração inicial de 50 µg/mL até 3,12 µg/ml e incubada por 24 horas. Células tratadas apenas com LPS foram utilizadas como controle negativo. Após incubação, a

produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess, com leitura da absorbância a 550 nm em leitor de microplacas. (BioTek®, EUA).

Os experimentos foram realizados em triplicata e analisados por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras A1 e A3 não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (3,12–50 $\mu\text{g/mL}$), mantendo valores de viabilidade próximos ou superiores a 90% em relação ao grupo controle. Já a amostra A2 reduziu a viabilidade celular dos macrófagos na concentração de 50 mg/mL ($p < 0,05$) e 75% nas concentrações entre 3,12 e 25 $\mu\text{g/mL}$, variando de $76,72 \pm 21,28\%$ a $120,8 \pm 0,85\%$. Esse resultado pode estar relacionado às diferenças na composição química das amostras, influenciada pela diversidade da vegetação, as áreas de coleta da própolis e o clima da região (Dutra et al., 2024).

Sobre a atividade anti-inflamatória, as amostras A1, A2 e A3 induziram a redução significativa da produção de NO nas concentrações 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, com IC₅₀ de 17,82 $\mu\text{g/mL}$, 25,72 $\mu\text{g/mL}$ e 25,05 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estudos demonstraram que a própolis e seus principais constituintes flavonoides (crisina, pinocembrina, galangina e pinobanksina) exercem efeitos anti-inflamatórios através da redução dos níveis de NO e pela regulação positiva da expressão de HO-1 (hidroxi-1-hidroxilase) e NQO-1 (nitrogênio hidroxilase) agindo contra o estresse oxidativo de maneira dependente da concentração (Silva et al., 2015; Li et al., 2024).

CONCLUSÃO

As amostras de própolis marrom produzidas por *Apis mellifera* em Anajatuba, Maranhão, inibem a produção de óxido nítrico de forma dose-dependente em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, demonstrando atividade anti-inflamatória *in vitro*. Não apresentam citotoxicidade relevante nas concentrações avaliadas, mantendo a viabilidade celular dos macrófagos. Os resultados contribuem para a valorização da biodiversidade amazônica maranhense, fornecendo subsídios para futuros estudos *in vivo*.

Apoio: FUNDECI/BNB, FAPEMA, CNPq, CAPES, FINEP, AGERP

REFERÊNCIAS

Bueno-Silva B; et al. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. *PLoS One*. 2015 Dec 14;10(12):e0144954. doi: 10.1371/journal.pone.0144954. PMID: 26660901; PMCID: PMC4684384.

Dutra RP, et al. Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. *Metabolites*. 2023 Sep 21;13(9):1027. doi: 10.3390/metabo13091027.

Garbis DVO, et al. Prophylactic use of standardized extract of propolis of *Apis mellifera* reduces lung inflammation and improves survival in experimental lethal sepsis. *J Ethnopharmacol*. 2024 Sep 15;331:118294. doi: 10.1016/j.jep.2024.118294.

Li, Z.; et al. Propolis alleviates acute lung injury induced by heat-inactivated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via regulating inflammatory mediators, gut microbiota and serum metabolites *Nutrients*, 16 (11) (2024), 10.3390/nu16111598

Man, M. Q. et al. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. *Inflammation*, v. 45, n. 3, p. 949-964, 2022.

INTRODUCTION

Inflammation is an essential biological response triggered by infections or tissue damage, acting as a defense mechanism of the body (Man et al., 2022). However, its dysregulation is associated with the pathophysiology of several chronic and inflammatory diseases, such as diabetes mellitus, obesity, rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases, and cancer, which involve inflammatory processes and oxidative stress that can cause cellular damage,

often aggravated by the excessive production of nitric oxide (NO) (Bueno-Silva, 2015).

In this context, propolis has aroused interest due to its anti-inflammatory and antioxidant properties, mainly attributed to the presence of flavonoids and phenolic compounds (Dutra et al., 2023). However, there are still gaps in studies of brown propolis from Maranhão, since variations in flora and climatic conditions can influence its chemical composition and biological activity (Garbis et al., 2024).

OBJECTIVE

To evaluate the cytotoxic and anti-inflammatory potential of brown propolis produced by *Apis mellifera* in Anajatuba, Maranhão, through in vitro assays.

MATERIALS AND METHODS

Propolis samples were collected from apiaries in Anajatuba, Maranhão, manually sanitized, and stored under refrigeration. Immediately afterward, the hydroethanolic extract was prepared in a 1:10 ratio according to the methodology of Dutra et al., 2023, with adaptations.

The cytotoxicity of brown propolis was evaluated in RAW 264.7 murine macrophages cultured in 96-well plates. Three samples of the hydroethanolic extract of brown propolis (A1, A2, and A3) were tested, which were collected from different locations in the Anajatuba region. The natural product was previously centrifuged, filtered, and subjected to serial 1:2 dilutions in DMEM medium, from a concentration of 50 µg/ml to 3.12 µg/ml. After incubation for 24 hours, cell viability was determined by the MTT assay with absorbance reading in a spectrophotometer at 550 nm (Biotek Elx800, Winooski, VT, USA).

The anti-inflammatory potential of the extract was evaluated in RAW 264.7 macrophages stimulated with 1 µg/mL of lipopolysaccharide to induce a cellular inflammatory response. Serial dilution (1:2) was performed at an initial concentration of 50 µg/mL up to 3.12 µg/mL and incubated for 24 hours. Cells treated only with LPS were used as a negative control. After incubation, NO production was determined by Griess reagent, with absorbance reading at 550 nm in a microplate reader (BioTek®, USA).

The experiments were performed in triplicate and analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Samples A1 and A3 did not show cytotoxicity at the tested concentrations (3.12–50 $\mu\text{g/mL}$), maintaining viability values close to or above 90% compared to the control group. Sample A2, however, reduced macrophage cell viability at a concentration of 50 mg/mL ($p < 0.05$) and by 75% at concentrations between 3.12 and 25 $\mu\text{g/mL}$, ranging from $76.72 \pm 21.28\%$ to $120.8 \pm 0.85\%$. This result may be related to differences in the chemical composition of the samples, influenced by the diversity of vegetation, the propolis collection areas, and the region's climate (Dutra et al., 2024).

Regarding anti-inflammatory activity, samples A1, A2 and A3 induced a significant reduction in NO production at concentrations 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, with IC_{50} of 17.82 $\mu\text{g/mL}$, 25.72 $\mu\text{g/mL}$ and 25.05 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Studies have demonstrated that propolis and its main flavonoid constituents (chrysin, pinocembrin, galangin and pinobanksin) exert anti-inflammatory effects by reducing NO levels and upregulating the expression of HO-1 (hydroxy-1-hydroxylase) and NQO-1 (nitrogen hydroxylase) acting against oxidative stress in a concentration-dependent manner (Silva et al., 2015; Li et al., 2024).

CONCLUSION

Samples of brown propolis produced by *Apis mellifera* in Anajatuba, Maranhão, inhibit nitric oxide production in a dose-dependent manner in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages, demonstrating in vitro anti-inflammatory activity. They do not exhibit relevant cytotoxicity at the concentrations evaluated, maintaining macrophage cell viability. The results contribute to the appreciation of the Amazonian biodiversity of Maranhão, providing support for future in vivo studies.

Support: FUNDECI/BNB, FAPEMA, CNPq, CAPES, FINEP, AGERP.

REFERENCES

Bueno-Silva B; et al. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. *PLoS One*. 2015 Dec 14;10(12):e0144954. doi: 10.1371/journal.pone.0144954. PMID: 26660901; PMCID: PMC4684384.

Dutra RP, et al. Brazilian Amazon Red Propolis: Leishmanicidal Activity and Chemical Composition of a New Variety of Red Propolis. *Metabolites*. 2023 Sep 21;13(9):1027. doi: 10.3390/metabo13091027.

Garbis DVO, et al. Prophylactic use of standardized extract of propolis of *Apis mellifera* reduces lung inflammation and improves survival in experimental lethal sepsis. *J Ethnopharmacol*. 2024 Sep 15;331:118294. doi: 10.1016/j.jep.2024.118294.

Li, Z.; et al. Propolis alleviates acute lung injury induced by heat-inactivated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via regulating inflammatory mediators, gut microbiota and serum metabolites *Nutrients*, 16 (11) (2024), 10.3390/nu16111598

Man, M. Q. et al. Regulatory Role of Nitric Oxide in Cutaneous Inflammation. *Inflammation*, v. 45, n. 3, p. 949-964, 2022.

Palavras-chave: própolis; macrófagos raw 2647; óxido nítrico; biodiversidade maranhens.