

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Maria José Abigail Mendes Araújo

**Estudo de parâmetros toxicológicos em animais
tratados com própolis e geoprópolis de abelhas
nativas do Maranhão**

São Luís
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Estudo de parâmetros toxicológicos em animais tratados com própolis e geoprópolis de abelhas nativas do Maranhão

Maria José Abigail Mendes Araújo

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro

Dissertação apresentada ao
Programa de Mestrado em
Biodiversidade e Conservação da
Universidade Federal do Maranhão,
como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em
Biodiversidade e Conservação.

São Luís
2009

Araújo, Maria José Abigail Mendes

Estudo de parâmetros toxicológicos em animais tratados com própolis e geoprópolis de abelhas nativas do Maranhão/ Maria José Abigail Mendes Araújo. – São Luís, 2009.

81f.;

Orientadora: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Co-orientadora: Maria Nilce de Sousa Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Mestrado em Biodiversidade e Conservação, 2009.

1. Própolis - Parâmetros toxicológicos 2. Toxicologia 3. *Melipona fasciculata* I. Estudo de parâmetros toxicológicos em animais tratados com própolis e geoprópolis de abelhas nativas do Maranhão.

CDU 638.135: 615.9

Autora: Maria José Abigail Mendes Araújo

Título: Estudo de parâmetros toxicológicos em animais tratados com própolis e geoprópolis de abelhas nativas do Maranhão

A Comissão julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 15/01/2009, considera a candidata Maria José Abigail Mendes Araújo..... .

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Orientadora
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria Nilce de Sousa Ribeiro
Co-orientadora
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. José Maurício Sforcin
1º examinador
Universidade Estadual Paulista

Profa. Dra. Flávia Maria Mendonça do Amaral
2º examinador
Universidade Federal do Maranhão

Dedicatória

*A Deus, doador de todas as coisas e razão do meu existir
À minha família, pelo amor e cuidado incondicionais*

Epígrafe

"O temor do Senhor é o princípio da sabedoria; revelam prudência todos os que o praticam." Salmo 111: 10

"Se hoje passarmos por um grande obstáculo, não o tomemos como derrota, mas continuemos, pela fé, a declarar vitória por intermédio daquele que é poderoso para fazer-nos mais do que vencedores. Aprendamos que em todos os lugares difíceis a que Deus nos leva, ele está criando oportunidades para exercitarmos a nossa fé, de tal forma que ela traga resultados positivos e glorifique o seu nome."
(Autor desconhecido)

"Porque sem Ele nada podeis fazer." João 15: 5b

Agradecimentos

Ao grande e poderoso Deus, por Seu amor que transforma, vivifica e renova meu ser. Quanto mais eu penso no quanto Ele tem feito por mim, mais alegria e satisfação sinto em saber que Ele é meu Senhor.

Aos meus pais, José Ribamar e Maria Helena, verdadeiras dádivas de Deus, por me amarem e me ensinarem a andar pelos caminhos que levam à vitória. À minha irmã Fernanda Araújo e à minha tia Dulce Mendes por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu amado Carlos Holanda, por seu modo natural de ser uma fonte de alegria e encorajamento para mim.

À Universidade Federal do Maranhão, em especial ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, pela oportunidade de realização deste curso e ao Biotério Central pelo fornecimento dos animais.

À Profa. Dra. Flávia Nascimento, que depositou confiança em mim, quando me aceitou como sua aluna no Laboratório de Imunofisiologia - UFMA. Nunca vou esquecer suas palavras, por ocasião do meu ingresso no Mestrado: “Estou super feliz com os seus resultados e muito confiante que passe na seleção.” Flávia, você sempre foi digna de minha admiração. Agradeço pela dedicação, ajuda, incentivo, paciência...

À Profa. Dra. Maria Nilce Ribeiro, que para mim é um grande exemplo de dedicação e força. Agradeço por abrir as portas do Laboratório de Farmacognosia - UFMA e do seu coração para me ajudar.

Ao médico e Prof. Msc. Adelson Lopes, por ter se comprometido em me ajudar, mesmo com tantas ocupações. Agradeço pela contribuição valiosa neste trabalho.

A todos os meus professores do Mestrado e do Departamento de Biologia pelos preciosos ensinamentos, em especial à Profa. Dra. Lenira Lacerda, pela orientação no estágio do Laboratório de Estudos sobre Abelhas (LEA) – UFMA, que foi essencial para que eu pudesse chegar até aqui. Ao Prof. Dr. Murilo Drummond pela ajuda e incentivo. À Profa. Dra. Gisele Garcia pelo apoio concedido para a conclusão deste trabalho.

À Profa. Dra. Rosane Guerra e à Profa. Dra. Flávia Amaral, pelo incentivo, sugestões e contribuições para o enriquecimento desta dissertação. Ao Prof. Dr.

José Maurício Sforcin, por ter aceitado fazer parte da avaliação deste trabalho, compartilhando da sua grande experiência e conhecimento na área de pesquisa com produtos apícolas.

Às instituições CAPES, FAPEMA, CNPq e Banco da Amazônia (BASA), pelo auxílio financeiro.

Ao Sr. Wilson Melo, pelo fornecimento das amostras de própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* (tubi), por sempre me receber tão bem em sua cidade (Barra do Corda - MA), pela amizade e troca de informações. Aos meliponicultores, Manuel Barros e Ilson Vieira, pela doação das amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* (tiúba).

A todos os funcionários do Mestrado em Biodiversidade e Conservação, em especial à secretária Ana Lúcia, pela ajuda e palavras de ânimo. Aos colegas de turma, pela convivência e experiências compartilhadas. Desejo que todos alcancem seus sonhos.

À farmacêutica bioquímica Anildes Sousa, pela ajuda nas análises bioquímicas.

À Profa. Dra. Favízia de Oliveira – Universidade Federal de Feira de Santana, pela identificação da abelha *Scaptotrigona* aff. *postica*.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto da Silva, pela revisão crítica do artigo: “Avaliação toxicológica aguda e subcrônica do extrato de própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* em ensaios pré-clínicos”.

Aos amigos e irmãos do Pequeno Grupo Siloé, pelas orações e palavras de ânimo.

A Sra. Joana Batista, por me considerar como mais uma filha, por saber me escutar e me dar bons conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Imunofisiologia (LIF), em especial a Nadia, Lucilene, Márcia, Silvana, Jeamile, Aramys, Mayara Tânia, Walmir Filho, Eder, Karine, Tonicley, Wanderson, Thiare, Graciomar, Sanara, Mayara Cristina, Luécia, Hidel, Jardel, Rubenice, Aluísio, Anderson. Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia, em especial a Richard, Izabel, Alexandre, Marisa e Bruno. Vocês me ensinaram muito mais do que pensam. Agradeço pelo carinho e colaboração. Jamais vou esquecer...

Que Deus ilumine o caminho de Todos!

Sumário

APRESENTAÇÃO	11
INTRODUÇÃO	12
Capítulo 1 (<i>Artigo submetido ao Journal of Ethnopharmacology</i>)	15
Avaliação toxicológica aguda e subcrônica do extrato de própolis de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>postica</i> em ensaios pré-clínicos	16
Resumo	17
Abstract	18
1. Introdução	19
2. Material e métodos	20
2.1. Coleta da própolis	20
2.2. Análise sensorial da própolis	21
2.3. Preparação do extrato hidroalcoólico de própolis	21
2.4. Abordagem química do EHP	21
2.5. Determinação da concentração de fenois totais do EHP	21
2.6. Determinação da concentração total de flavonoides do EHP	21
2.7. Determinação da concentração de ácidos fenólicos do EHP	22
2.8. Animais	22
2.9. Avaliação da toxicidade aguda do EHP	22
2.10. Avaliação da toxicidade subcrônica do EHP	23
2.11. Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos	23
2.12. Necropsia dos órgãos	23
2.13. Análise estatística	24
3. Resultados	24
3.1. Análises sensoriais da própolis de <i>Scaptotrigona</i> aff. <i>postica</i>	24
3.2. Rendimento e abordagem química do EHP de <i>S. aff. postica</i>	24
3.3. Determinação da concentração de flavonóides, ácidos fenólicos e fenois totais do EHP de <i>S. aff. postica</i>	24

3.4.	<i>Toxicidade aguda e subcrônica</i>	24
3.4.1.	<i>Investigação da DL₅₀ e alterações comportamentais</i>	24
3.4.2.	<i>Consumo diário de ração e água</i>	25
3.4.3.	<i>Peso dos órgãos vitais</i>	25
3.4.4.	<i>Análise hematológica e bioquímica</i>	25
3.4.5.	<i>Análise histopatológica do fígado</i>	26
4.	Discussão	26
	Agradecimentos	30
	Referências	31
	Tabelas e figuras	37
	Capítulo 2 (<i>Artigo submetido à Revista Food and Chemical Toxicology</i>)	46
	Avaliação toxicológica pré-clínica aguda e subcrônica do extrato de geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i> Smith	47
	Resumo	48
	Abstract	49
1.	Introdução	50
2.	Material e métodos	52
2.1.	<i>Coleta de material</i>	52
2.2.	<i>Análise sensorial da geoprópolis</i>	52
2.3.	<i>Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis</i>	52
2.4.	<i>Abordagem química do EHG</i>	52
2.5.	<i>Determinação da concentração de fenóis totais do EHG</i>	52
2.6.	<i>Determinação da concentração total de flavonóides do EHG</i>	53
2.7.	<i>Determinação da concentração de ácidos fenólicos do EHG</i>	53
2.8.	<i>Animais</i>	53
2.9.	<i>Avaliação da toxicidade aguda do EHG</i>	53
2.10.	<i>Avaliação da toxicidade subcrônica do EHG</i>	54
2.11.	<i>Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos</i>	54

2.12.	<i>Necropsia dos órgãos</i>	55
2.13.	<i>Análise estatística</i>	55
3.	Resultados	55
3.1.	<i>Análises sensoriais da geoprópolis de <i>Melipona fasciculata</i></i>	55
3.2.	<i>Rendimento e abordagem química do EHG de <i>Melipona fasciculata</i></i>	55
3.3.	<i>Determinação da concentração de flavonóides, ácidos fenólicos e fenois totais do EHG de <i>Melipona fasciculata</i></i>	55
3.4.	<i>Toxicidade aguda</i>	56
3.4.1.	<i>Investigação da DL_{50} e alterações comportamentais</i>	56
3.5.	<i>Toxicidade subcrônica</i>	56
3.5.1.	<i>Peso corpóreo e dos órgãos vitais</i>	56
3.5.2.	<i>Análise hematológica e bioquímica</i>	56
4.	Discussão	57
	Conflito de interesses	62
	Agradecimentos	62
	Referências	62
	Tabelas	70
	DISCUSSÃO	74
	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78
	ANEXOS	81

APRESENTAÇÃO

O uso de produtos apícolas no tratamento e alívio de diversos estados patológicos é uma prática que acompanha a humanidade desde a antiguidade. Nas últimas décadas, muitos trabalhos foram publicados para divulgar e revisar as propriedades da própolis de abelhas do gênero *Apis*. Contudo, ainda são incipientes os estudos com própolis de abelhas nativas sem ferrão. É sabido que muitos produtos naturais apresentam substâncias que podem desencadear efeitos adversos, por sua própria composição química ou pela presença de contaminantes, exigindo um rigoroso controle de qualidade. Diante disso, o presente trabalho se propôs a desenvolver um estudo de parâmetros toxicológicos em animais tratados com própolis de abelhas nativas do Maranhão.

A presente dissertação é composta por dois capítulos, que abordam os temas: “Avaliação toxicológica aguda e subcrônica do extrato de própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* em ensaios pré-clínicos” e “Avaliação toxicológica pré-clínica aguda e subcrônica do extrato de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith”, ambos com a finalidade de fornecer parâmetros de segurança no uso dos produtos, contribuindo para a valorização da meliponicultura no Estado. O primeiro artigo foi encaminhado para o jornal: “Journal of Ethnopharmacology” e o segundo para à revista: “Food and Chemical Toxicology”, sendo redigidos de acordo com as normas de cada periódico.

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Maranhão, nos seguintes laboratórios: 1- Laboratório de Farmacognosia: preparação dos extratos hidroalcoólicos de própolis de *S. aff. postica* e de geoprópolis de *M. fasciculata*; 2- Laboratório de Imunofisiologia: ensaios toxicológicos; 3- Laboratório de Histologia: análise histopatológica. O projeto foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Banco da Amazônia (Processo: BASA-265/2006). As amostras de própolis de *S. aff. postica* e de geoprópolis de *M. fasciculata* foram gentilmente doadas pelos meliponicultores Wilson Melo e Manuel Barros, respectivamente. A própolis é proveniente de Barra do Corda, região de cerrado, e a geoprópolis é oriunda de Palmeirândia, região com grande diversidade de ecossistemas. Estes municípios encontram-se localizados no estado do Maranhão.

INTRODUÇÃO

O interesse pelas abelhas sociais e pelos recursos produzidos por estas acompanha a história do homem desde a antiguidade. Segundo a classificação de Silveira et al. (2002), as abelhas sociais pertencem à família Apidae, e encontram-se divididas em duas subfamílias: Apinae, com a espécie mais conhecida e estudada, *Apis mellifera* L., e Meliponinae, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, distribuídas amplamente nos Neotrópicos.

Os meliponíneos coletam material resinoso das plantas e misturam com enzimas mandibulares, cera e pólen, formando própolis (NOGUEIRA-NETO, 1997), como *Scaptotrigona* aff. *postica* (tubi – Anexo 1A). Porém, algumas espécies de Meliponinae, adicionam terra ou barro para a produção de geoprópolis (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997; CASTALDO; CAPASSO, 2002; FREITAS et al., 2008). Neste grupo, encontra-se *Melipona fasciculata* Smith (tiúba – Anexo 1B), uma abelha social típica do Maranhão. Ambos os produtos são utilizados pelas abelhas para desinfetar os favos, revestir as paredes internas, embalsamar insetos mortos no interior da colméia e proteger a entrada contra intrusos (GHISALBERTI, 1979; BURDOCK, 1998).

A utilização popular de seus produtos, com fins terapêuticos, provém de diferentes origens e culturas tradicionais. Uma rica cultura com relação às abelhas sem ferrão pode ser encontrada, ainda hoje, entre os povos indígenas, como os índios Kayapó (SANTOS; ANTONINI, 2008). No Maranhão, *Melipona fasciculata* vem sendo criada há séculos pelas populações indígenas e ocupa lugar de destaque, principalmente na produção de mel e geoprópolis (KERR, 1996).

As abelhas são importantes agentes de manutenção da biodiversidade, e podem ser indicadores biológicos do equilíbrio ambiental, muito útil no esforço da conservação da biodiversidade e exploração sustentável do meio ambiente, podendo a própria apicultura e meliponicultura constituir alternativas ecologicamente corretas e autossustentáveis de explorar ambientes naturais ainda não degradados, ou recuperar áreas ameaçadas (FREITAS, 1999).

A criação comercial de *S. aff. postica* e *M. fasciculata* no estado do Maranhão (Anexos 2A e 2B), denominada meliponicultura, reúne algumas características bastante favoráveis. O Estado possui um grande número de ecossistemas. Dessa forma, a matéria prima que serve de suporte para o trabalho das abelhas, origina-se na abundante biodiversidade regional (DUTRA, 2008). Porém, a degradação do

ambiente por ações humanas vem reduzindo a densidade de seus ninhos (REGO et al., 2008).

As amostras de própolis (Anexo 3A) de *Scaptotrigona aff. postica* são provenientes do município de Barra do Corda (5° 30' S, 45° 14' W), localizado na parte central do Estado, região de cerrado e resquícios de vegetação amazônica (IBGE, 2004). As amostras de geoprópolis (Anexo 3B) de *Melipona fasciculata* são provenientes do município de Palmeirândia (2° 39' S, 44° 55' W), localizado na Baixada maranhense, região formada por diferentes ecossistemas, como manguezais, campos inundáveis, lagoas, babaçuais e florestas (MOURA, 2004). Portanto, os resultados apresentados neste trabalho refletem as diferenças na composição química dos produtos.

Atualmente, pesquisas com o objetivo de identificar, caracterizar e relacionar efeitos farmacológicos e toxicológicos dos compostos dos produtos de origem natural são realizadas, uma vez que o profundo conhecimento da composição e variabilidades que esses podem apresentar, constituem passos fundamentais para o aproveitamento racional destes produtos.

Em virtude disso, desde 2003, pesquisadores da área de Produtos Naturais das Universidades Federal e Estadual do Maranhão estão realizando estudos sobre a própolis de tubi e geoprópolis de tiúba, com resultados bastante promissores. A avaliação farmacológica pré-clínica da própolis de tubi já foi realizada apenas acerca da atividade antitumoral em modelos de tumores sólidos experimentais (ARAÚJO, 2007) e sua atividade *in vitro* contra diferentes micro-organismos (FARNESI, 2007; MAIA-FILHO et al., 2008). Nogueira (2008) descreveu suas características organolépticas e sua composição físico-química. A abordagem química da própolis de tubi mostra grande concentração de substâncias fenólicas e triterpênicas, substâncias com atividade antioxidante e antitumoral.

Gomes (2005) estudou a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da geoprópolis de tiúba. Também foi observado que o bochecho com a solução do extrato alcoólico de geoprópolis de tiúba diminuiu 48,5% o número de colônias de *Streptococcus mutans* na saliva de pacientes, atuando como auxiliar no tratamento e na prevenção da cárie (DUALIBE et al., 2007). Dutra et al. (2008) comprovaram que amostras de geoprópolis de tiúba, oriundas da Baixada maranhense, possuem altos valores de flavonoides. Assunção (2008) mostrou que o extrato hidroalcoólico de geoprópolis de tiúba possui atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, comprovando

ainda que o tratamento profilático com esse extrato aumenta a sobrevivência dos animais testados.

A própolis de *S. aff. postica* é utilizada popularmente na cicatrização de feridas e tem indicado grande possibilidade no tratamento de tumores malignos (CARDINALI, 2005). Além disso, o extrato de própolis também é usado no tratamento de doenças respiratórias e em processos inflamatórios (informação verbal)¹. A geoprópolis é utilizada empiricamente no tratamento de doenças respiratórias, do trato digestivo, na fertilidade feminina, em dermatoses e distúrbios visuais (FREITAS et al., 2008).

Apesar dos efeitos terapêuticos e do uso popular desses produtos, não há estudos pré-clínicos sobre parâmetros toxicológicos. Sabe-se que muitos produtos naturais apresentam substâncias que podem desencadear efeitos adversos, por seus próprios constituintes ou pela presença de contaminantes, exigindo um rigoroso controle de qualidade. Diante disso, avaliou-se neste trabalho a toxicidade aguda e subcrônica dos extratos hidroalcoólicos de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* e de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.

Porém, o objetivo vai além de uma investigação toxicológica, pois pretende também contribuir para o estabelecimento do perfil de qualidade destes produtos e assegurar que os mesmos possam ser consumidos com segurança. A ausência de uma legislação própria para produtos de abelhas nativas tem se constituído um verdadeiro entrave para o desenvolvimento da meliponicultura no nosso Estado. Esta atividade tem representado um campo bastante promissor de geração de trabalho e renda nos municípios maranhenses (OLIVEIRA et al., 2005). Espera-se com os resultados obtidos contribuir com o aumento da produtividade, agregando valor a esses produtos.

¹ Informação fornecida por Wilson Amorim Melo, doador das amostras de própolis de *Scaptotrigona aff. postica*, em julho de 2006.

Capítulo 1

Artigo submetido ao Journal of Ethnopharmacology

Avaliação toxicológica aguda e subcrônica do extrato de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* em ensaios pré-clínicos

M.J.A.M. Araújo^a, N.S. Mattar^a, A.S. Reis^a, I.C.P.B. Serra^b, E.M.S. Fialho^a,
A.K.M. Assunção^a, R.P. Dutra^b, A.M.C.Nogueira^b, S.A. Libério^a, R.N.M.
Guerra^a, A.S. Lopes^c, M.N.S. Ribeiro^b, F.R.F. Nascimento^{a,*}

^a *Laboratório de Imunofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 65085-580 São Luís, MA, Brasil*

^b *Laboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 65085-580 São Luís, MA, Brasil*

^c *Laboratório de Histologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 65085-580 São Luís, MA, Brasil*

Autor para correspondência: Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Endereço: Av. dos Portugueses s/n, Prédio do Integrado, Bloco 1, Sala 1A, Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, CEP: 65085-580 São Luís, Maranhão – Brasil.

Tel.: +55-98-21098548

*E-mail address: nascimentoofrf@yahoo.com.br

Resumo

A própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* é utilizada popularmente no estado do Maranhão, Brasil, no tratamento de feridas e de doenças respiratórias. Porém, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos adversos do seu uso. Este estudo avaliou a toxicidade aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *S. aff. postica*. No estudo foram utilizados 96 camundongos Swiss (machos e fêmeas), sendo metade para avaliação da toxicidade aguda e a outra metade para a toxicidade subcrônica. Na toxicidade aguda, os animais receberam por via oral doses únicas de EHP nas concentrações de 1000, 2000 ou 4000 mg/kg e foram observados por 14 dias. Para avaliação da toxicidade subcrônica, os animais receberam EHP por via oral diariamente por 15 dias, nas concentrações de 100, 200 ou 400 mg/kg. Os animais foram sacrificados e sangue e órgãos foram retirados para avaliação bioquímica, hematológica e histopatológica. O EHP não induziu mortes. O tratamento agudo reduziu significativamente a concentração sérica de alanina transaminase e fosfatase alcalina, enquanto o tratamento subcrônico reduziu significativamente a concentração de aspartato transaminase e aumentou triglicérides apenas nos machos. Na análise histopatológica do fígado foi observado leve infiltrado leucocitário nos grupos que receberam as maiores doses e leve esteatose no tratamento subcrônico. Os dados indicam que o extrato hidroalcoólico de própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* possui baixa toxicidade quando utilizado por via oral, mesmo em altas doses e em tratamentos subcrônicos.

Palavras-chave: Toxicidade; Própolis; *Scaptotrigona* aff. *postica*; Abelhas sem ferrão

Abstract

Propolis of *Scaptotrigona aff. postica* is popularly used in Maranhão State, Brazil, for treating wounds and respiratory illnesses. Nevertheless little is known about the possible adverse effects its usage. This study evaluated the acute and subchronic toxicity of propolis hydroalcoholic extract (PHE) from *S. aff. postica*. In the study 96 Swiss mice (males and females) were used, half to evaluate the acute toxicity and half for subchronic toxicity. In acute toxicity, the animals received oral single doses of PHE in concentrations of 1000, 2000 or 4000 mg/kg and were observed for 14 days. For subchronic toxicity evaluation, the mice received daily PHE during 15 days in concentrations of 100, 200 or 400 mg/kg. The animals were sacrificed and blood and organs were removed for biochemical, hematological and histopathology evaluation. The PHE did not induce death and the acute treatment significantly reduced serum concentrations of alanine aminotransferase and alkaline phosphatase, while the subchronic treatment significantly reduced aspartate aminotransferase concentration and increased triglycerides only in the male mice. In the liver's histopathological analysis it was observed slight leucocytes infiltration in the mice groups that received higher doses and slight steatosis in the subchronic treatment. Data indicate that the propolis hydroalcoholic extract (PHE) from *S. aff. postica* has low toxicity when used orally, even in high doses and in subchronic treatments.

Keywords: Toxicity; Propolis; *Scaptotrigona aff. postica*; Stingless bees

1. Introdução

Própolis é uma mistura de composição química complexa, formada pela associação de resinas e bálsamos vegetais coletados pelas abelhas e potencializados pela adição de enzimas mandibulares, cera e pólen. Este produto é utilizado na colmeia para proteger a entrada, revestir as paredes internas, desinfetar os favos e embalsamar insetos mortos, para manter o ambiente interno asséptico, o que está relacionado com a sua comprovada atividade antimicrobiana e antisséptica (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998; Salatino et al., 2005).

As fontes botânicas, a origem geográfica e a espécie de abelha são fatores que explicam a variabilidade química da própolis nas regiões tropicais (Salatino et al., 2005), que está entre os problemas relacionados a padronização deste produto (Bankova, 2005).

Estudos farmacológicos com a própolis de *Apis mellifera* L. mostraram atividade antitumoral (Orsolic e Basic, 2005), antimicrobiana (Mohammadzadeh et al., 2007; Libério et al., 2009), antifúngica (Murad et al., 2002), antioxidante (Ahn et al., 2004), hepatoprotetora (Bhadauria et al., 2008), anti-inflamatória, anestésica, cicatrizante (Dobrowolski et al., 1991), dentre outras.

Estudos pré-clínicos sobre a toxicidade aguda e subcrônica mostram que a própolis de *A. mellifera* possui baixa toxicidade (Hollands et al., 1991; Burdock, 1998; Araújo et al., 2002; Mani et al., 2006; Jasprica et al., 2007).

As propriedades biológicas da própolis de *A. mellifera* são extensas, porém são incipientes os estudos com produtos de abelhas nativas sem ferrão, como é o caso de *Scaptotrigona* aff. *postica*, popularmente conhecida no Maranhão como tubi. As abelhas deste gênero distribuem-se por toda a região Neotropical e inclui espécies que constroem seus ninhos em cavidades pré-existentes (Silveira et al., 2002).

A própolis de *S. aff. postica* é popularmente usada na cicatrização de feridas e no tratamento de tumores malignos (Cardinali, 2005). O extrato de própolis é utilizado no tratamento de doenças respiratórias e em alguns processos inflamatórios.

Maia-Filho et al. (2008) mostraram a sua atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Enterococcus faecalis*. Entretanto, não há estudos pré-clínicos sobre parâmetros toxicológicos para avaliar a segurança do uso deste produto.

Os parâmetros mais utilizados para estudos toxicológicos são os hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Os dados hematológicos do sangue periférico são importantes indicadores do estado fisiológico e patológico em humanos e animais (Adeneye et al., 2006). A análise de parâmetros bioquímicos e histopatológicos permite estabelecer a existência de lesões nos órgãos, sobretudo hepáticas ou renais, bem como sua gravidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de própolis de *Scaptotrigona aff. postica*, por meio de parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos, de acordo com a Portaria nº 116/96 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 1996). Tendo em vista que a própolis de *S. aff. postica* é usada popularmente no tratamento de doenças e que a criação de abelhas nativas sem ferrão é uma atividade inserida nos arranjos produtivos para o desenvolvimento do Maranhão, localizado no nordeste do Brasil.

2. Material e métodos

2.1. Coleta da própolis

A própolis de *Scaptotrigona aff. postica*, foi doada pelo meliponicultor Sr. Wilson Melo. As amostras foram coletadas de forma asséptica, em julho de 2007, na comunidade Cerâmica, no município de Barra do Corda (5° 30' S, 45° 14' W), localizado na parte central

do estado do Maranhão, onde predomina a vegetação de cerrado com resquícios de floresta amazônica.

2.2. Análise sensorial da própolis

As amostras de própolis, após coletas, foram submetidas a análises sensoriais de aroma, cor e sabor (Brasil, 2001).

2.3. Preparação do extrato hidroalcoólico de própolis

A amostra de própolis (480g) foi triturada em turbolizador e macerada com etanol 70%, na proporção de 1:3, por 24 h. Em seguida, o material foi filtrado e concentrado a vácuo em rotaevaporador, resultando no extrato hidroalcoólico de própolis (EHP). O EHP foi acondicionado em frascos âmbar e mantido sob refrigeração. Para a realização das análises toxicológicas, o EHP foi solubilizado com dimetil sulfóxido (DMSO) a 1% (Duran et al., 2008) e ressuspenso em água destilada.

2.4. Abordagem química do EHP

O EHP foi submetido à abordagem química para verificação de compostos das seguintes classes: fenólicos, terpenos e esteroides (Matos, 1997).

2.5. Determinação da concentração de fenóis totais do EHP

A concentração dos polifenólicos totais foi determinada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio a 20%, usando espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis a 760 nm. Concentrações de ácido gálico (Merck) foram usadas como padrões (Woisky e Salatino, 1998; Chaillou et al., 2004; Funari e Ferro, 2006).

2.6. Determinação da concentração total de flavonoides do EHP

A concentração de flavonoides foi determinada utilizando o método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3) para formar o complexo, usando espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis a 425 nm. Concentrações de quercetina (Merck) foram usadas como padrões e os resultados obtidos foram expressos como grama (g) de quercetina por 10 mL de extrato

hidroalcoólico de própolis (Woisky e Salatino, 1998; Chaillou et al., 2004; Funari e Ferro, 2006).

2.7. Determinação da concentração de ácidos fenólicos do EHP

A concentração de ácidos fenólicos foi determinada pela diferença entre as quantidades dosadas de flavonoides e fenólicos totais (Woisky e Salatino, 1998).

2.8. Animais

Foram utilizados 96 camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, com aproximadamente 120 dias de idade, 25-35g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Imunofisiologia sob condições ambientais padronizadas, alimentados com uma dieta balanceada e água *ad libitum*. A utilização dos animais obedeceu a princípios técnicos e éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo CEP/UFMA nº 009283/2008-12).

2.9. Avaliação da toxicidade aguda do EHP

A toxicidade aguda do EHP foi avaliada pela determinação da dose responsável pela morte de 50% dos animais (DL₅₀). Os animais foram divididos em 4 grupos de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) os quais foram tratados, uma única vez, por via oral, com solução de DMSO (1%), 1000, 2000 e 4000 mg de EHP/kg de animal. Os animais foram observados constantemente nas primeiras 48 horas e em intervalos de 3 dias. Antes e ao final do período de observação, os animais foram submetidos a jejum sólido por 12 horas.

Os sinais de toxicidade e mortalidade foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Malone (1977) (Anexo 4) e observados até 14 dias após o tratamento. Nesse período de observação foram mensurados em intervalos de 3 dias os seguintes parâmetros: consumo de ração e água e registro da letalidade. Para cada grupo foram colocados 150g de ração e 250mL de água filtrada, sendo obtido o consumo médio total e diário.

2.10. Avaliação da toxicidade subcrônica do EHP

A toxicidade subcrônica foi avaliada a partir do tratamento com doses múltiplas do EHP, para avaliar o efeito cumulativo do extrato. Os animais foram divididos em 4 grupos, tratados com solução de DMSO (1%), 100, 200 e 400 mg de EHP/kg de animal, respectivamente. O tratamento foi de 15 dias, sendo administradas doses diárias, por via oral (gavagem), seguindo-se os mesmos parâmetros da toxicidade aguda.

2.11. Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

As amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção caudal, após o período de observação. Os esfregaços foram corados com a utilização do kit Instant Prov (Newprov), e a leitura realizada em microscópio óptico em objetiva de imersão (aumento de 100x) (Oliveira, 2007).

Para a análise bioquímica, as amostras de sangue foram coletadas do plexo retro-orbital e centrifugadas a 1500 rpm, por 10 minutos. O soro obtido foi utilizado na determinação da concentração sérica de: uréia, creatinina, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), colesterol total (CT) e triglicérides (TG), por meio de procedimentos automatizados – Architect - C8000 (Abbott®), com a utilização de kits da Labtest - Brasil.

2.12. Necropsia dos órgãos

Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para retirada do fígado, estômago, intestino, coração e rim. Todos os órgãos foram pesados e submetidos à análise macroscópica. A análise histopatológica, só foi realizada no fígado. Esse órgão foi fixado em formol 10% e colocado em parafinas. Secções de 5µm de diâmetro foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico de luz comum, com objetivas de 10 e 40. Os cortes foram fotografados em fotomicroscópio (Olympus PM-104 K3), com aumento de 400x. Os seguintes parâmetros

foram avaliados: infiltrado gorduroso ou esteatose, infiltrado leucocitário, vasos congestos, hemorragia, figuras de mitose, vascularização, necrose e degeneração tecidual, conforme laudos realizados no Laboratório de Histologia da UFMA (Anexo 5).

2.13. Análise estatística

Os resultados foram analisados com auxílio do Software Graph Pad Prism, versão 5.0, por análise de variância (ANOVA One-way), seguida pelo teste de Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5% (Sokal e Rohlf, 1995). Os dados foram expressos com a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de 12 animais por grupo e 6 animais por sexo.

3. Resultados

3.1. Análises sensoriais da própolis de *Scaptotrigona aff. postica*

A própolis possui odor resinoso, sabor amargo e coloração marrom clara.

3.2. Rendimento e abordagem química do EHP de *Scaptotrigona aff. postica*

O rendimento do processo extrativo da amostra de própolis de *Scaptotrigona aff. postica* obtido por maceração com etanol 70% foi de 3,81%. A abordagem química do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) indicou grande concentração de substâncias fenólicas e triterpênicas e ausência de substâncias da classe dos esteroides.

3.3. Determinação da concentração de flavonoides, ácidos fenólicos e fenois totais do EHP de *Scaptotrigona aff. postica*

Os teores de flavonoides, ácidos fenólicos e fenois totais encontrados no EHP foram de $0,55 \pm 0,07\%$; $11,40 \pm 0,73\%$ e $11,95 \pm 0,80\%$, respectivamente.

3.4. Toxicidade aguda e subcrônica

3.4.1. Investigação da DL_{50} e alterações comportamentais

O tratamento agudo oral com EHP não provocou mortes, inviabilizando, portanto, o cálculo da dose letal mediana (DL_{50}). Todos os animais (machos e fêmeas) tratados com EHP

nas três doses (1000, 2000 e 4000 mg/kg) apresentaram menor mobilidade, quando comparados aos animais dos grupos controle. Nas fêmeas do grupo EHP 4000, outros sinais de toxicidade ocorreram tais como: piloereção, convulsão, tremores, hiperemia, reação de fuga e agressividade, nas primeiras quatro horas de observação.

3.4.2. Consumo diário de ração e água

O tratamento agudo não induziu alterações significativas no consumo diário de ração e água, em ambos os sexos. No tratamento subcrônico foi observada uma diminuição significativa no consumo de ração dos machos dos grupos EHP 100 e EHP 200, em relação ao controle (Figura 1A). Além disso, o consumo de água também diminuiu no grupo EHP 200, em ambos os sexos, quando comparados aos grupos controle (Figura 1B).

3.4.3. Peso dos órgãos vitais

O tratamento agudo induziu diminuição significativa no peso do estômago nos machos tratados com EHP nas três doses, em relação ao controle. Nas fêmeas, esta alteração ocorreu nos grupos EHP 1000 e EHP 4000. No grupo EHP 2000, o rim e o coração foram os órgãos que apresentaram diminuição significativa de peso em relação ao controle (Tabela 1).

O tratamento subcrônico induziu nos machos do grupo EHP 100, uma significativa diminuição no peso do coração. Nos grupos EHP 200 e EHP 400, houve aumento do estômago. Além disso, no grupo EHP 400, houve aumento do intestino, quando comparado com o grupo controle. Ao contrário dos machos, não ocorreram alterações no peso dos órgãos das fêmeas dos grupos EHP 100 e EHP 400. Porém, no grupo EHP 200, houve aumento significativo no peso do estômago e do coração em relação ao controle (Tabela 2).

3.4.4. Análise hematológica e bioquímica

O tratamento agudo com EHP, por via oral, não alterou os parâmetros hematológicos, de nenhum animal, independentemente de sexo, tempo ou dose de tratamento, quando

comparados aos grupos controle (Tabela 3). O tratamento subcrônico com EHP só induziu alterações significativas nos machos do grupo EHP 400 (Tabela 4).

Em relação à bioquímica, nos machos ocorreu redução significativa na concentração de ALT nos grupos EHP 1000 e EHP 4000 em relação ao controle. Além disso, no grupo EHP 4000 ocorreu também redução na concentração de TG. Nas fêmeas, a redução da concentração de ALT ocorreu em todos os grupos tratados com EHP. Nos grupos EHP 2000 e EHP 4000 houve também redução de ALP, quando comparados com o grupo controle (Tabela 5). Como observado na Tabela 6, nos machos dos grupos EHP 100 e EHP 200 ocorreu significativo aumento de TG. No entanto, ocorreu redução de AST nos grupos tratados com as doses de 200 e 400 mg/kg, sempre em comparação com o grupo controle.

3.4.5. Análise histopatológica do fígado

A avaliação microscópica mostrou morfologia regular do parênquima do fígado com hepatócitos e sinusóides bem delimitados nos grupos controle (Figuras 2A, 3A e 3B). Na avaliação da toxicidade aguda foi possível detectar leve infiltrado leucocitário no grupo EHP 1000 (Figura 2B). Nas fêmeas, esta alteração foi observada no grupo EHP 2000 (Figura 2C). Nenhum animal do grupo EHP 4000 apresentou alterações microscópicas no fígado.

Na avaliação da toxicidade subcrônica foi detectada esteatose leve no fígado dos machos dos grupos EHP 100 e EHP 200 (Figuras 3C e 3E) e das fêmeas dos grupos EHP 100 e EHP 400 (Figuras 3D e 3F). Além disso, ocorreu também nas fêmeas do grupo EHP 400 uma moderada infiltração leucocitária (Figura 3G).

4. Discussão

Própolis de *Scaptotrigona* aff. *postica* mostrou odor resinoso, coloração marrom clara e sabor amargo, cujas características organolépticas foram mantidas no extrato hidroalcoólico. Segundo Funari e Ferro (2006) as análises sensoriais de própolis merecem

atenção, pois podem indicar o caminho analítico a se seguir ou até mesmo permitir deduções prévias de características físico-químicas da amostra. O aroma e sabor indicam se a amostra é nova ou se foi produzida pelas abelhas há muito tempo, o que tornaria essas características menos acentuadas.

A abordagem química do EHP indicou maior concentração de substâncias fenólicas do que de substâncias triterpênicas. Os teores de flavonoides (0,55%) e fenóis totais (11,95%) do EHP medidos por espectrometria do UV apresentaram valores acima do mínimo (0,25% e 0,50%) exigidos pela legislação brasileira para a caracterização de qualidade e identidade do extrato hidroalcoólico de própolis de *Apis mellifera* (Brasil, 2001). Ressalta-se a falta de legislação para a própolis de outras espécies de abelhas. Compostos fenólicos foram identificados em própolis brasileira de abelhas sem ferrão, como *Melipona fasciculata* (Abreu et al., 2006; Dutra et al., 2008), *Scaptotrigona bipunctata* (Velikova et al., 2000), *Tetragonisca angustula* (Miorin et al., 2003), e em própolis venezuelana de *Scaptotrigona depilis* (Tomás-Barberan et al., 1993). Os percentuais dos compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos indicam que essas classes de substâncias contribuem de forma mais acentuada na composição de própolis do que os flavonoides.

O ensaio de toxicidade aguda por via oral mostrou que o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) não induziu a morte de animais, mesmo quando foram submetidos ao tratamento com altas doses (1000, 2000 e 4000 mg/kg). Segundo Barros e Davino (2003) e de acordo com a Portaria nº 116/96 da ANVISA - Brasil, a dose limite para avaliação toxicológica aguda é 2000 mg/kg, o que mostra o baixo efeito tóxico do extrato utilizado neste estudo. Além disso, o estudo da toxicidade subcrônica para avaliar o efeito cumulativo do produto, também não induziu morte. Para a própolis de *A. mellifera*, a DL₅₀ em camundongos está acima de 7300 mg/kg (Burdock, 1998), mas vale ressaltar que não encontramos estudos prévios sobre a toxicidade da própolis de abelhas sem ferrão.

Embora não tenha causado morte, o estudo da toxicidade aguda com EHP induziu menor mobilidade em todos os animais. Porém, as fêmeas tratadas com a maior dose apresentaram outros sinais de toxicidade. Estas alterações podem ser indicativas de ação depressora no sistema nervoso central e autônomo, embora de forma leve. Determinadas condições estressantes induzem a liberação de neurotransmissores, hormônios e citocinas, mostrando a associação entre o sistema nervoso central com os sistemas endócrino e imunológico, por meio da ativação do eixo hipotálamo pituitária adrenal e do sistema nervoso autônomo (Kioukia-Fougia et al., 2002; Missima e Sforcin, 2008).

As propriedades relaxantes e sedativas de certos tipos de compostos fenólicos, tais como flavonoides e o cafeato de feniletila, componentes ativos da própolis de *A. mellifera* já foram previamente descritas (Marcucci et al., 2001). Por outro lado, alguns autores têm relatado os efeitos neuroprotetores dos constituintes da própolis, principalmente devido aos efeitos antioxidantes e imunomodulatórios (Noelker et al., 2005; Sforcin, 2007). Portanto, os efeitos citados não indicam, necessariamente, que o EHP de *S. aff. postica* possua neurotoxicidade, mas podem indicar uma possível ação relaxante e sedativa.

O tratamento agudo com EHP não alterou o consumo de ração e água em nenhum dos grupos. Porém, no tratamento subcrônico, a ingestão de ração dos machos foi diminuída nos grupos EHP 100 e EHP 200. No entanto, estes sinais não foram observados nas fêmeas (Figura 1A). Segundo Barros e Davino (2003), alterações no consumo de alimentos representam um efeito adverso de menor gravidade.

Quanto ao estudo hematológico, nenhuma alteração foi observada, exceto nos machos do grupo EHP 400 submetidos ao tratamento subcrônico (Tabelas 3 e 4). O sistema hematopoiético é um importante indicador do estado fisiológico e patológico em humanos e animais (Adeneye et al., 2006). Assim, a ausência de efeitos nesses parâmetros é indicativa de baixa toxicidade.

Nos animais submetidos ao ensaio de toxicidade aguda, a redução da concentração de ALT detectada nos grupos tratados com EHP, em ambos os sexos (Tabela 5), pode estar relacionada a um possível efeito hepatoprotetor, tendo em vista os resultados que demonstraram que extratos de própolis de *A. mellifera* podem diminuir os níveis séricos de aminotransferases, promovendo efeito hepatoprotetor (Bhadauria et al., 2008; Nirala e Bhadauria, 2008).

Segundo Bhadauria et al. (2008), a redução destas enzimas no sangue pode ser decorrente da acelerada regeneração de células parenquimais do fígado sob a influência de flavonoides e ésteres presentes na própolis. Estes compostos ajudam a melhorar a fragilidade da membrana de hepatócitos e, por consequência, diminuem a concentração de aminotransferases na circulação.

Na avaliação do perfil lipídico, foi possível notar que somente a concentração de triglicérides (TG) foi afetada, mesmo assim, somente nos machos do grupo EHP 4000 (Tabela 5). Resultados semelhantes foram anteriormente descritos por Bhadauria et al. (2008), em relação a toxicidade da própolis de *A. mellifera*, só que nesse caso ocorreu também redução na concentração de colesterol total e esterificado, o que não aconteceu nos nossos ensaios.

Nas fêmeas tratadas com EHP além da redução nos níveis de ALT, também houve redução da ALP nos grupos tratados com as maiores doses (2000 e 4000 mg/kg - Tabela 5), o que reforça a hipótese da ação hepatoprotetora do EHP. Essa hipótese encontra respaldo nos resultados obtidos por Havsteen (2002) que mostra com vários exemplos que flavonóides podem inibir uma variedade de enzimas, incluindo hidrolases e fosfatase alcalina.

Por outro lado, o tratamento subcrônico com EHP induziu algumas alterações no metabolismo lipídico dos animais. O aumento na concentração de TG nos machos dos grupos EHP 100 e EHP 200 (Tabela 6) pode estar relacionado com a leve esteatose observada no fígado dos animais desses grupos (Figuras 3C e 3E).

As lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDLs) são produzidas no fígado e compostas predominantemente de triglicérides. Sua função é transportar este lipídio do fígado aos tecidos periféricos, onde será degradado pela lipase lipoprotéica. A infiltração gordurosa ou esteatose ocorre em condições nas quais existe um desequilíbrio entre a síntese hepática de TG e a secreção de VLDL (Champe e Harvey, 2002).

Em conclusão, os teores de fenois e flavonoides do EHP de *Scaptotrigona aff. postica*, permitem caracterizar quimicamente o produto, base para estabelecer um perfil de garantia de qualidade para o mesmo. O uso de EHP de *Scaptotrigona aff. postica* por via oral tanto de forma aguda quanto subcrônica, não induziu a morte dos camundongos, mesmo após o tratamento com elevadas doses. No ensaio toxicológico agudo, as alterações comportamentais foram mais evidentes nas fêmeas, porém a não persistência das alterações mostra que o EHP não causou graves efeitos neurotóxicos. O tratamento agudo com EHP teve efeito hepatoprotetor, em ambos os sexos e não induziu alterações hematológicas em nenhum dos grupos. Além disso, foi possível constatar que tanto o tratamento agudo quanto o subcrônico, não causou efeitos nefrotóxicos, pois não ocorreu alteração detectável na concentração sérica de uréia e creatinina.

Este trabalho agrega valor a um importante produto da biodiversidade do Maranhão – Brasil, pois grande parte de sua população tem visto a meliponicultura, criação de abelhas indígenas sem ferrão, como uma oportunidade de trabalho e renda. Espera-se com estes resultados colaborar para a segurança do uso popular da própolis com finalidade terapêutica, além de dar suporte para o estabelecimento do perfil de qualidade deste produto.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado para M.J.A.M.A. À Fundação de Amparo a Pesquisa no

Maranhão (FAPEMA) pela bolsa de N.S.M. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de A.S.R., I.C.P.B.S., E.M.S.F. e F.R.F.N. Ao PET/ SESU/ MEC pela bolsa de A.K.M.A. Ao Banco da Amazônia (BASA) pelo auxílio financeiro (Processo: BASA - 265/ 2006). Ao meliponicultor Sr. Wilson Melo pela doação das amostras de própolis. À Profa. Dra. Gisele Garcia Azevedo pelo apoio concedido para a conclusão deste trabalho. À Profa. Dra. Favízia Freitas de Oliveira, pela identificação dos exemplares de abelhas. À farmacêutica bioquímica Anildes Iran Pereira Sousa pela ajuda nas análises bioquímicas. Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Moura da Silva pela revisão crítica do manuscrito.

Referências

- Abreu, B.V.B., Batista, M.C.A., Azevedo, C.C., Dutra, R.P., Nogueira, A.M.C., Costa, M.C.P., Ribeiro, M.N.S., 2006. Quantificação de polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túbia) coletado no cerrado maranhense. Revista de Ciências da Saúde 8, 18-24.
- Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P., Adeleke, T.I., Bello, S.O., 2006. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. Journal of Ethnopharmacology 105, 374-379.
- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.S., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. Journal of Agricultural Food Chemistry 52, 7286-7292.
- Araújo, C.E.P., Shimizu, M.T., Cunha, I.B.S., Marcucci, M.C., Ramos, O.H.P., Sawaya, A.C.H.F., 2002. Análise química, toxicológica e antiulcerogênica preliminar de uma amostra de própolis da região do Paraná. Revista Lecta 20, 47-52.

- Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 114–117.
- Barros, S.B.M, Davino, S.C., 2003. Avaliação da Toxicidade. In: S. Oga., *Fundamentos de Toxicologia*, 2. ed., Atheneu, São Paulo, p. 57-67.
- Bhadauria, M., Nirala, S.K., Shukla, S., 2008. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2703–2712.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36, 347-363.
- Brasil, 1996. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/96. Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterapêuticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.
- Brasil, 2001. Instrução Normativa nº 3 – anexo VI. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.
- Cardinali, S.S.B, 2005. As autoras da biodiversidade. *Jornal da Universidade de São Paulo*, Ribeirão Preto, SP. Disponível em: <http://www.biodiversityreporting.org/index.php>.
- Chaillou, L.L., Herrera, H.A., Maidana, J.F., 2004. Estudo de própolis de Santiago del Estero, Argentina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24, 11-15.
- Champe, P.C., Harvey, R.A., 2002. *Bioquímica Ilustrada*. 2. ed. Artes Médicas Sul (ARTMED), Porto Alegre, 446p.
- Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A., Dandiya, P.C., 1991. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology* 35, 77-82.

- Duran, G., Duran, N., Culha, G., Ozcan, B., Oztas, H., Ozer, B., 2008. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitology Research* 102, 1217-1225.
- Dutra, R.P., Nogueira, A.M.C., Marques, R.R.O., Costa, M.C.P., Ribeiro, M.N.S., 2008. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) em municípios da Baixada maranhense, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18, 557-562.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., 2006. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26, 171-178.
- Ghisalberti, E.L., 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60, 59-84.
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 96, 67-202.
- Hollands, I., Vidal, A., Gra, B., Sotolongo, M., 1991. Estudio evaluativo de la toxicidad subcronica del propoleos cubano. *Revista Cubana de Ciencias Veterinárias* 22, 91-100.
- Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolic-Bubalo, A., Medic-Saric, M., Mayer, L., Romic, Z., Bucan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V., 2007. *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacology* 110, 548–554.
- Kioukia-Fougia, N., Antoniou, K., Bekris, S., Liapi, C., Christofidis, I., Papadopoulou-Daifoti, Z., 2002. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 26, 823-830.
- Libério, S.A., Pereira, A.L.A., Araújo, M.J.A.M., Dutra, R.P., Nascimento, F.R.F., Monteiro-Neto, V., Ribeiro, M.N.S., Gonçalves, A.G., Guerra, R.N.M., 2009. The potencial use of

- propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*, doi: 10.1016/j.jep.2009.04.047.
- Maia-Filho, E.M., Maia, C.C.R., Bastos, A.C.S.C., Novais, T.M.G., 2008. Efeito antimicrobiano *in vitro* de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. *Revista Gaúcha de Odontologia* 56, 21-25.
- Malone, M.H., 1977. In: *New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological, biological or Therapeutical activity*. Sringer-Verlag, Berlin, p. 23-53.
- Mani, F., Damasceno, H.C.R., Novelli, E.L.B., Martins, E.A.M., Sforcin, J.M., 2006. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology* 105, 95–98.
- Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 105–112.
- Matos, F.J.A., 1997. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2. ed. Edições UFC, Fortaleza, 141p.
- Missima, F., Sforcin, J.M., 2008. Green brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 5, 71-75.
- Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkhaniha, R, Samadi, N., Ostad, S.N., 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry* 103, 1097-1103.
- Miorin, P.L., Levy Junior, N.C., Custodio, A.R., Bretz, W.A., Marcucci, M.C., 2003. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 95, 913-920.

- Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., Bankova, V., Sforcin, J.M., 2002. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 331-334.
- Nirala, S. K., Bhadauria, M., 2008. Synergistic effects of ferritin and propolis in modulation of beryllium induced toxicogenic alterations. *Food and Chemical Toxicology*, doi: 10.1016/j.fct.2008.06.009.
- Noelker, C., Bacher, M., Gocke, P., Wei, X., Klockgether, T., Dub, Y., Dodel, R., 2005. The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity. *Neuroscience Letters* 383, 39-43.
- Oliveira, R.A.G., 2007. Hemograma: como fazer e interpretar. Livraria Médica Paulista Editora, São Paulo, 544p.
- Oršolic, N., Bašić, I, 2005. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 561–570.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine* 2, 33-38.
- Sforcin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 1–14.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. *Composição e Arte*, Belo Horizonte, 253p.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd ed. W. H. Freeman and company, New York, 887p.
- Tomás-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F., 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34, 191-196.

- Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M.C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., 2000. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift fur Naturforschung* 55, 785-789.
- Woisky, R.G.R., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* 37, 99-105.

Tabela 1

Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o peso dos órgãos dos camundongos

Grupos	Sexo	Peso final animal	Órgãos				
			Fígado	Estômago	Intestino	Coração	Rim
Controle	Macho	32 ± 1 ^a	1554 ± 18 ^b	630 ± 12	3782 ± 69	189 ± 3	269 ± 4
	Fêmea	26 ± 0	1225 ± 17	512 ± 7	2962 ± 42	138 ± 2	172 ± 1
EHP 1000	Macho	33 ± 1	1653 ± 29	499 ± 8*	3862 ± 63	178 ± 2	261 ± 3
	Fêmea	26 ± 0	1198 ± 6	403 ± 4*	3316 ± 58	134 ± 1	168 ± 1
EHP 2000	Macho	32 ± 0	1578 ± 14	513 ± 8*	3514 ± 32	188 ± 3	249 ± 3
	Fêmea	25 ± 0	1217 ± 14	478 ± 8	2881 ± 15	119 ± 2*	151 ± 1*
EHP 4000	Macho	30 ± 0	1486 ± 5	491 ± 9*	3495 ± 30	188 ± 3	247 ± 1
	Fêmea	24 ± 0	1225 ± 21	457 ± 3*	2885 ± 26	131 ± 2	159 ± 2

^a Os valores representam a média ± E.P.M., expresso em g, n = 6 / grupo.

^b Os valores representam a média ± E.P.M., expresso em mg, n = 6 / grupo.

* p < 0,05 em relação ao grupo controle do mesmo sexo, ANOVA, seguido do teste de Tukey.

Tabela 2

Efeito do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o peso dos órgãos dos camundongos

Grupos	Sexo	Peso final animal	Órgãos				
			Fígado	Estômago	Intestino	Coração	Rim
Controle	Macho	28 ± 1 ^a	1228 ± 10 ^b	442 ± 2	2820 ± 54	144 ± 1	210 ± 2
	Fêmea	25 ± 0	1053 ± 16	468 ± 1	2749 ± 47	134 ± 1	163 ± 2
EHP 100	Macho	24 ± 0	1169 ± 11	420 ± 5	2662 ± 19	127 ± 1*	192 ± 1
	Fêmea	25 ± 1	1109 ± 14	496 ± 4	2739 ± 24	142 ± 1	160 ± 1
EHP 200	Macho	26 ± 0	1161 ± 5	498 ± 6*	2903 ± 19	136 ± 1	202 ± 1
	Fêmea	24 ± 1	1090 ± 13	549 ± 13*	2928 ± 34	164 ± 2*	160 ± 3
EHP 400	Macho	29 ± 1	1296 ± 14	555 ± 5*	3541 ± 49*	140 ± 1	222 ± 2
	Fêmea	24 ± 0	1002 ± 3	483 ± 5	2750 ± 31	134 ± 1	173 ± 2

^a Os valores representam a média ± E.P.M., expresso em g, n = 6 / grupo.

^b Os valores representam a média ± E.P.M., expresso em mg, n = 6 / grupo.

* p < 0,05 em relação ao grupo controle do mesmo sexo, ANOVA, seguido do teste de Tukey.

Tabela 3

Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* sobre os parâmetros hematológicos dos camundongos

Grupos	Sexo	Parâmetros (%)				
		Monócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos
Controle	Macho	4 ± 1 ^a	61 ± 1	35 ± 1	0	0
	Fêmea	1 ± 0	62 ± 1	38 ± 1	0	0
EHP 1000	Macho	4 ± 0	60 ± 2	35 ± 2	1 ± 0	1 ± 0
	Fêmea	3 ± 1	52 ± 2	45 ± 3	0	0
EHP 2000	Macho	4 ± 0	56 ± 2	39 ± 2	0	1 ± 0
	Fêmea	3 ± 1	53 ± 2	44 ± 2	0	0
EHP 4000	Macho	3 ± 0	52 ± 2	44 ± 1	0	0
	Fêmea	2 ± 0	57 ± 1	42 ± 1	0	0

^a Os valores representam a média ± E.P.M. de 6 animais/ grupo.

Tabela 4

Efeito do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* sobre os parâmetros hematológicos dos camundongos

Grupos	Sexo	Parâmetros (%)				
		Monócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Basófilos
Controle	Macho	3 ± 1 ^a	70 ± 1	27 ± 1	0	0
	Fêmea	4 ± 0	45 ± 3	51 ± 3	0	0
EHP 100	Macho	2 ± 1	63 ± 2	35 ± 2	0	0
	Fêmea	3 ± 1	43 ± 3	54 ± 3	0	0
EHP 200	Macho	5 ± 1	59 ± 1	36 ± 2	0	0
	Fêmea	3 ± 1	53 ± 4	44 ± 3	0	0
EHP 400	Macho	4 ± 0	54 ± 2*	42 ± 2*	0	0
	Fêmea	3 ± 0	41 ± 3	56 ± 4	0	0

^a Os valores representam a média ± E.P.M. de 6 animais/ grupo.

* p < 0,05 em relação ao grupo controle do mesmo sexo, ANOVA, seguido do teste de Tukey.

Tabela 5

Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* sobre os parâmetros bioquímicos dos camundongos

Grupos	Sexo	Parâmetros						
		Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)
Controle	Macho	72 ± 2 ^a	0,2 ± 0,0	113 ± 10	33 ± 2	92 ± 18	149 ± 3	207 ± 5
	Fêmea	55 ± 1	0,2 ± 0,0	125 ± 2	37 ± 1	117 ± 4	111 ± 2	235 ± 14
EHP 1000	Macho	70 ± 2	0,2 ± 0,0	110 ± 4	13 ± 2*	122 ± 14	130 ± 2	163 ± 4
	Fêmea	52 ± 1	0,2 ± 0,0	147 ± 10	27 ± 1*	115 ± 3	112 ± 2	190 ± 4
EHP 2000	Macho	72 ± 2	0,2 ± 0,0	109 ± 6	21 ± 1	110 ± 14	143 ± 4	161 ± 13
	Fêmea	49 ± 2	0,2 ± 0,0	128 ± 8	26 ± 2*	78 ± 3*	112 ± 5	175 ± 8
EHP 4000	Macho	80 ± 4	0,3 ± 0,0	128 ± 8	16 ± 3*	78 ± 13	126 ± 2	142 ± 5*
	Fêmea	74 ± 9	0,3 ± 0,0	136 ± 9	25 ± 3*	93 ± 5*	99 ± 2	191 ± 11

^a Os valores representam a média ± E.P.M. de 6 animais/ grupo. AST=aspartato transaminase, ALT=alanina transaminase, ALP=fosfatase alcalina, CT=colesterol total, TG=triglicérides. * p < 0,05 em relação ao grupo controle do mesmo sexo, ANOVA, seguido do teste de Tukey.

Tabela 6

Efeito do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* sobre os parâmetros bioquímicos dos camundongos

Grupos	Sexo	Parâmetros						
		Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	CT (mg/dL)	TG (mg/dL)
Controle	Macho	69 ± 2 ^a	0,2 ± 0,0	111 ± 10	13 ± 2	103 ± 18	120 ± 3	132 ± 5
	Fêmea	54 ± 1	0,4 ± 0,0	142 ± 10	23 ± 1	86 ± 5	118 ± 3	193 ± 6
EHP 100	Macho	72 ± 2	0,2 ± 0,0	96 ± 9	14 ± 2	153 ± 14	132 ± 4	242 ± 11*
	Fêmea	53 ± 1	0,3 ± 0,0	138 ± 5	26 ± 1	102 ± 6	112 ± 3	165 ± 6
EHP 200	Macho	74 ± 3	0,2 ± 0,0	70 ± 4*	11 ± 2	90 ± 7	131 ± 3	242 ± 12*
	Fêmea	58 ± 4	0,3 ± 0,0	147 ± 16	27 ± 7	95 ± 14	111 ± 2	183 ± 6
EHP 400	Macho	64 ± 2	0,3 ± 0,0	73 ± 3*	14 ± 1	122 ± 10	129 ± 3	183 ± 8
	Fêmea	53 ± 1	0,3 ± 0,0	138 ± 10	28 ± 3	123 ± 7	115 ± 2	184 ± 3

^a Os valores representam a média ± E.P.M. de 6 animais/ grupo. AST=aspartato transaminase, ALT=alanina transaminase, ALP=fosfatase alcalina, CT=colesterol total, TG=triglicérides. * p < 0,05 em relação ao grupo controle do mesmo sexo, ANOVA, seguido do teste de Tukey.

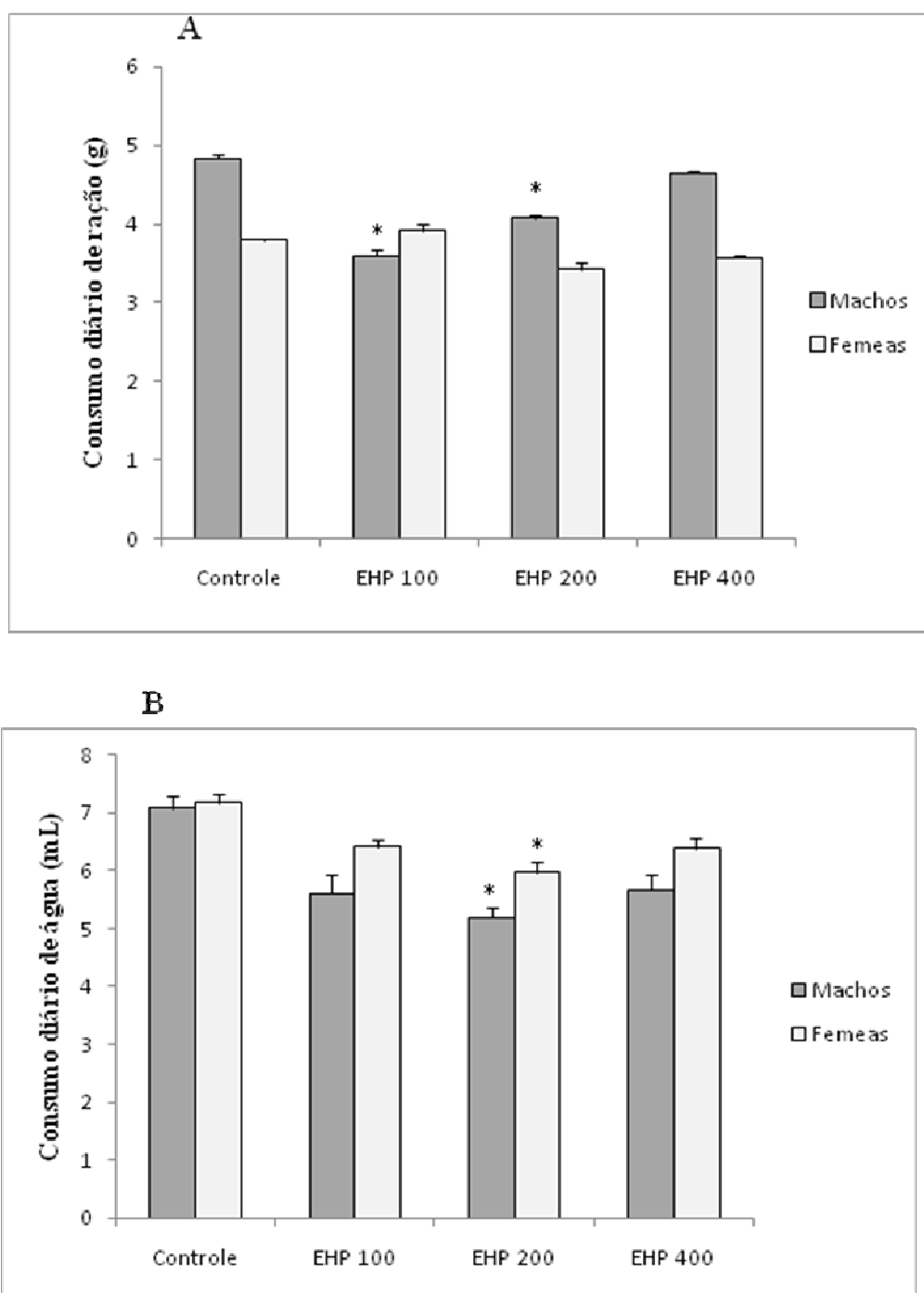


Figura 1. Efeito do tratamento subcrônico com o EHP de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o consumo diário de ração e água. A mensuração do consumo de ração (A) e água (B) dos machos (barras cinzas) e das fêmeas (barras brancas) foi realizada a cada 3 dias. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

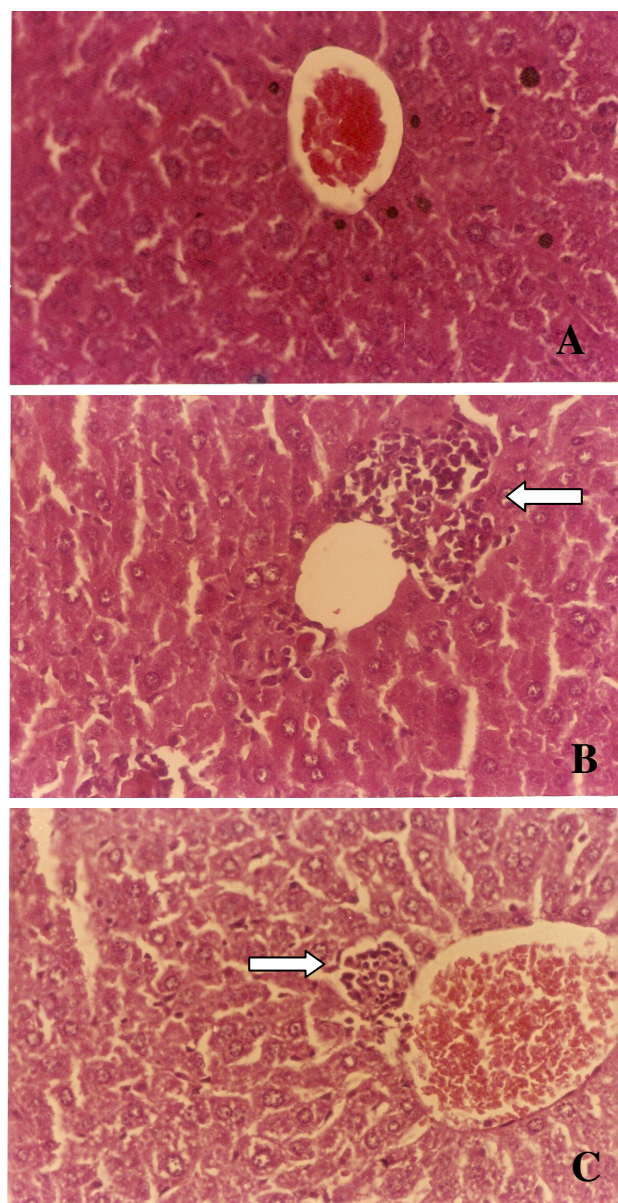


Figura 2. Análise histopatológica do fígado de camundongos em ensaio de toxicidade aguda. (A) Grupo controle, tratado com solução de DMSO (1%), mostrando morfologia regular do parênquima do fígado; (B) Machos do grupo EHP 1000, mostrando um leve infiltrado leucocitário (seta); (C) Fêmeas do grupo EHP 2000, mostrando um leve infiltrado leucocitário (seta). Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x.

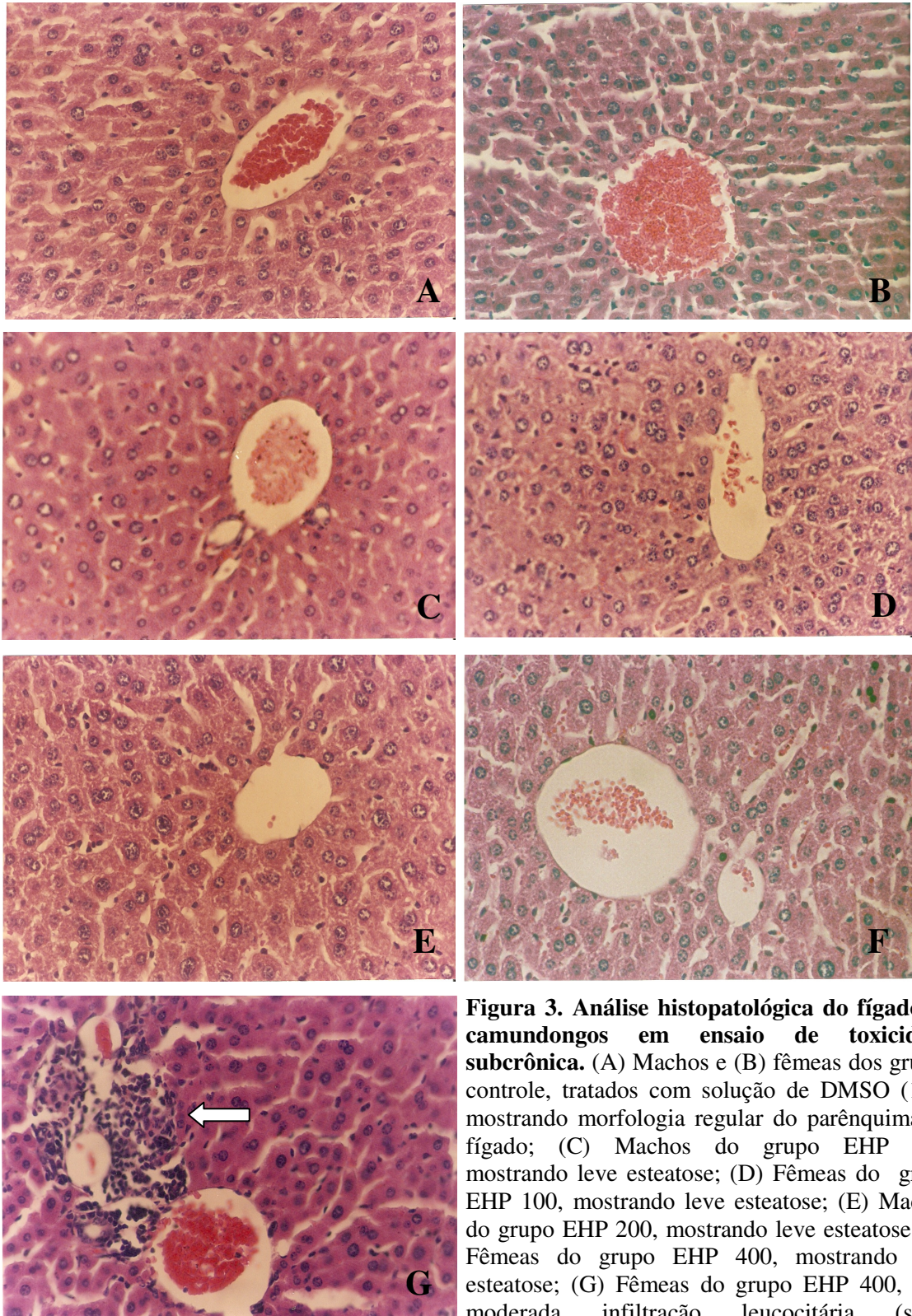


Figura 3. Análise histopatológica do fígado de camundongos em ensaio de toxicidade subcrônica. (A) Machos e (B) fêmeas dos grupos controle, tratados com solução de DMSO (1%), mostrando morfologia regular do parênquima do fígado; (C) Machos do grupo EHP 100, mostrando leve esteatose; (D) Fêmeas do grupo EHP 100, mostrando leve esteatose; (E) Machos do grupo EHP 200, mostrando leve esteatose; (F) Fêmeas do grupo EHP 400, mostrando leve esteatose; (G) Fêmeas do grupo EHP 400, com moderada infiltração leucocitária (seta). Coloração Hematoxilina-Eosina, 400x.

Capítulo 2

Artigo submetido à Revista Food and Chemical Toxicology

Avaliação toxicológica pré-clínica aguda e subcrônica do extrato de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith

M.J.A.M. Araújo^a, A.S. Reis^a, A.K.M. Assunção^a, E.M.S. Fialho^a, I.C.P.B. Serra^b, G.C. Costa^a, S.M. Sousa^a, L.A. Silva^a, R.P. Dutra^b, R.N.M. Guerra^a, M.N.S. Ribeiro^b, F.R.F. Nascimento^{a,*}

^a *Laboratório de Imunofisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 65085-580 São Luís, MA, Brasil*

^b *Laboratório de Farmacognosia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, 65085-580 São Luís, MA, Brasil*

Autor para correspondência: Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Endereço: Av. dos Portugueses s/n, Prédio do Integrado, Bloco 1, Sala 1A, Laboratório de Imunofisiologia, Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, CEP: 65085-580 São Luís, Maranhão – Brasil.

Tel.: +55-98-21098548

*E-mail address: nascimentoofrf@yahoo.com.br

Resumo

A geoprópolis de abelhas sem ferrão é utilizada empiricamente em tratamentos de pele e visão e de doenças gastrointestinais e respiratórias. Porém, pouco é conhecido sobre os possíveis efeitos adversos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith no estado do Maranhão, Brasil. Os efeitos da administração aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) de *M. fasciculata* foram investigados em camundongos Swiss. No estudo foram utilizados 96 animais (machos e fêmeas), sendo metade para avaliação da toxicidade aguda e a outra metade para a toxicidade subcrônica. Na toxicidade aguda, os animais receberam por via oral doses únicas de EHG nas concentrações de 1000, 2000 ou 4000 mg/kg e foram observados por 14 dias. Para avaliação da toxicidade subcrônica, os animais foram tratados diariamente por 15 dias com EHG (100, 200 ou 400 mg/kg). Os animais foram sacrificados e sangue e órgãos foram retirados para avaliação hematológica e bioquímica. O EHG não induziu mortes. Nos parâmetros hematológicos, registrou-se leucopenia inespecífica nos grupos EHG 100 e EHG 200, enquanto nos parâmetros bioquímicos ocorreu aumento significativo na concentração de glicose e aspartato transaminase, nestes mesmos grupos. Contudo, houve redução dos níveis de fosfatase alcalina, mostrando que o tratamento com EHG não induziu graves danos hepáticos. Os dados indicam que o extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith possui baixa toxicidade, quando usado oralmente, em altas doses. Porém, induz alguma toxicidade hepática em tratamentos subcrônicos.

Palavras-chave: Toxicidade; Geoprópolis; *Melipona fasciculata*; Abelhas sem ferrão

Abstract

Stingless bees' geopropolis is empirically used for treating skin, sight, gastro-intestinal and respiratory diseases. However, little is known about the adverse effects of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis in Maranhão State, Brazil. The effects of acute and subchronic administration of *M. fasciculata* geopropolis hydroalcoholic extract (GHE) were investigated in Swiss mice. In the study 96 animals (male and female) were used, half for evaluate the acute toxicity and half for subchronic toxicity. In the acute toxicity the mice received GHE single oral doses in concentrations of 1000, 2000 or 4000 mg/kg and were observed for 14 days. For subchronic toxicity evaluation, the mice were daily treated with GHE (100, 200 or 400 mg/kg) for 15 days. The animals were then sacrificed and samples of blood and organs were collected for hematological and biochemical evaluation. The GHE did not induce death. In the hematological parameters, nonspecific leukopenia was recorded in GHE 100 and GHE 200 groups, while in the biochemical parameters there was significant increase in the concentration of glucose and aspartate aminotransferase in the same groups. Nevertheless, there was reduction in alkaline phosphatase levels, showing that the GHE treatment did not induce severe hepatic damage. Data indicate that the geopropolis hydroalcoholic extract (GHE) from *M. fasciculata* has low toxicity when used orally in high doses, but it induces some hepatic toxicity in subchronic treatments.

Keywords: Toxicity; Geopropolis; *Melipona fasciculata*; Stingless bees

1. Introdução

Própolis é uma mistura constituída de substâncias resinosas e balsâmicas coletadas por abelhas de uma variedade de plantas, que depois de enriquecidas com suas secreções mandibulares, serve para proteger a colméia contra intrusos, desinfetar os favos, revestir as suas paredes internas e embalsamar insetos mortos, o que está relacionado com a sua atividade antisséptica e antimicrobiana (Burdock, 1998; Castaldo e Capasso, 2002; Salatino et al., 2005).

As atividades biológicas da própolis de *Apis mellifera* L. são atribuídas a diversas classes de compostos químicos, principalmente dos ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos, (Menezes, 2005). Porém, essa composição varia com a época do ano, condições geográficas e origem botânica (Sforcin et al., 2001), havendo uma maior variabilidade de compostos quando a própolis pertence a regiões tropicais, onde há uma maior diversidade florística (Bankova et al., 2000).

Muitas propriedades já foram comprovadas através de estudos farmacológicos, dentre as quais podemos destacar sua atividade antimicrobiana (Simões et al., 2008; Libério et al., 2009), antiprotozoária (Giorgio et al., 2006), antifúngica (Murad et al., 2002), antioxidante (Ahn et al., 2004), antitumoral (Padmavathi et al., 2006), anti-inflamatória, anestésica, cicatrizante (Dobrowolski et al., 1991), dentre outras.

Estudos pré-clínicos sobre a toxicidade aguda e subcrônica mostram que a própolis de *A. mellifera* possui baixa toxicidade (Burdock, 1998; Mani et al., 2006; Jasprica et al., 2007; Sforcin, 2007). Essas investigações são concentradas quase que exclusivamente na própolis de *A. mellifera* (Bankova et al., 2000), porém ainda são escassas as informações sobre produtos de abelhas nativas sem ferrão (Freitas et al., 2008), como é o caso de *Melipona fasciculata* Smith, popularmente conhecida como tiúba, no estado do Maranhão, Brasil.

A espécie *M. fasciculata* encontra-se distribuída nas regiões tropicais, especialmente na América do Sul (Silveira et al., 2002), e é criada há séculos pelas populações indígenas maranhenses para a produção de mel e geoprópolis, o qual é derivado da mistura de material resinoso das plantas com cera e terra (Kerr, 1996).

A geoprópolis é utilizada empiricamente no tratamento de doenças respiratórias, do trato digestivo, na fertilidade feminina, em dermatoses e desordens visuais (Freitas et al., 2008). Nos últimos anos, tem ocorrido maior interesse por pesquisas com geoprópolis de abelhas nativas, sobretudo com relação à sua composição química (Tomás-Barberan et al., 1993; Bankova et al., 1998; Abreu et al., 2006; Bankova e Popov, 2007; Dutra et al., 2008; Freitas et al., 2008) e atividade antibacteriana (Velikova, 2000; Duailibe et al., 2007). Entretanto, não há estudos pré-clínicos sobre parâmetros toxicológicos para avaliar a segurança do uso deste produto.

Os parâmetros mais utilizados para estudos toxicológicos são os hematológicos, bioquímicos e histopatológicos. Os dados hematológicos do sangue periférico são importantes indicadores do estado fisiológico e patológico em humanos e animais (Adeneye et al., 2006). A análise de parâmetros bioquímicos e histopatológicos permite estabelecer a existência de lesões nos órgãos, sobretudo hepáticas ou renais, bem como sua gravidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata*, por meio de parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos, de acordo com a Portaria nº 116/96 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 1996). Tendo em vista que a geoprópolis de *M. fasciculata*, é amplamente utilizada pela população nordestina do Brasil, especialmente no estado do Maranhão e diante da importância social, econômica, ecológica e desenvolvimento da meliponicultura, criação de abelhas indígenas sem ferrão.

2. Material e métodos

2.1. Coleta de material

A geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith foi doada pelo Sr. Manuel Barros, criador destas abelhas. As amostras foram coletadas de forma asséptica, em setembro de 2006, no município de Palmeirândia (2° 39' S, 44° 55' W), localizado na região alagada da Baixada maranhense. Os municípios da Baixada maranhense são formados por diferentes ecossistemas, como manguezais, campos inundáveis, lagoas, babaçuais e florestas (Moura, 2004).

2.2. Análise sensorial da geoprópolis

As amostras de geoprópolis, após coletas, foram submetidas a análises sensoriais de aroma, cor e sabor (Brasil, 2001).

2.3. Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis

A amostra de geoprópolis (700 g) foi triturada em turbolizador e macerada com etanol 70%, por 48h. Em seguida, o material foi filtrado para separação da parte inorgânica (terra) e concentrado a vácuo em rotaevaporador, resultando no extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG). O EHG foi acondicionado em frascos âmbar e mantido sob refrigeração (Abreu et al., 2006; Dutra et al., 2008). Para a realização das análises toxicológicas, o EHG foi solubilizado com dimetil sulfoxido (DMSO) a 1% (Duran et al., 2008) e ressuspensão em água destilada.

2.4. Abordagem química do EHG

O EHG foi submetido à abordagem química para verificação de compostos das classes dos fenóis, terpenos e esteroides (Matos, 1997).

2.5. Determinação da concentração de fenóis totais do EHG

A concentração dos polifenólicos totais foi determinada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio a 20%, usando espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis a

760 nm. Concentrações de ácido gálico (Merck) foram usadas como padrões (Woisky e Salatino, 1998; Chaillou et al., 2004; Funari e Ferro, 2006).

2.6. Determinação da concentração total de flavonóides do EHG

A concentração de flavonoides foi determinada utilizando o método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3) para formar o complexo, usando espectrofotômetro Cary 50 UV-Vis a 425 nm. Concentrações de quercetina (Merck) foram usadas como padrão de referência (Woisky e Salatino, 1998; Chaillou et al., 2004; Funari e Ferro, 2006).

2.7. Determinação da concentração de ácidos fenólicos do EHG

A concentração de ácidos fenólicos foi determinada pela diferença entre as quantidades dosadas de flavonoides e fenólicos totais (Woisky e Salatino, 1998).

2.8. Animais

Foram utilizados 96 camundongos machos e fêmeas da linhagem Swiss, com aproximadamente 120 dias de idade, 25-30g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Imunofisiologia sob condições ambientais padronizadas, alimentados com uma dieta balanceada e água *ad libitum*. A utilização dos animais obedeceu a princípios técnicos e éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo CEP/UEMA nº 010/2007).

2.9. Avaliação da toxicidade aguda do EHG

A toxicidade aguda do EHG foi avaliada pela determinação da dose responsável pela morte de 50% dos animais (DL_{50}). Os animais foram divididos em 4 grupos de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas), os quais foram tratados, uma única vez, por via oral (gavagem), com solução de DMSO (1%), 1000, 2000 ou 4000 mg de EHG/kg de animal. Os animais foram observados constantemente nas primeiras 48 horas e em intervalos de 3 dias. Antes e ao final do período de observação, os animais foram submetidos a jejum sólido por 12 horas.

Os sinais de toxicidade e mortalidade foram analisados de acordo com a metodologia descrita por Malone (1977) e observados até 14 dias após o tratamento. Nesse período de observação foram mensurados em intervalos de 3 dias os seguintes parâmetros: consumo de ração e água e registro da letalidade. Para cada grupo foram colocados 150g de ração e 250mL de água filtrada, sendo obtido o consumo médio total e diário.

2.10. Avaliação da toxicidade subcrônica do EHG

A toxicidade subcrônica foi avaliada a partir do tratamento com doses múltiplas do EHG, para avaliar o efeito cumulativo do extrato. Os animais foram divididos em 4 grupos, tratados com solução de DMSO (1%), 100, 200 ou 400 mg de EHG/kg de animal, respectivamente. O tratamento foi de 15 dias, sendo administradas doses diárias, por via oral, seguindo-se os mesmos parâmetros da toxicidade aguda.

2.11. Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina a 2% (Rompum®) (20mg/kg) e ketamina a 5% (Vetanarcol®) (25mg/kg) via intramuscular, ao final do tratamento. As amostras de sangue dos animais foram coletadas do plexo retro-orbital e o sangue transferido para tubos cônicos contendo ou não ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para obtenção de sangue total e soro, respectivamente. Os esfregaços foram corados com a utilização do kit Instant Prov (Newprov). Os parâmetros hematológicos (eritrócitos totais, leucócitos totais/diferencial e plaquetas) foram avaliados em microscópio óptico em objetiva de imersão (aumento de 100x) (Oliveira, 2007).

Para a análise bioquímica, as amostras de sangue foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos, para determinação da concentração sérica de glicose, albumina, uréia, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e triglicérides (TG), segundo técnicas descritas no kit Labtest®.

2.12. Necropsia dos órgãos

Após a coleta de sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para retirada do fígado, estômago, intestino, coração e rim. Todos os órgãos foram pesados e submetidos à análise macroscópica.

2.13. Análise estatística

Os resultados foram analisados com a utilização do Software Graph Pad Prism, versão 5.0, por análise de variância (ANOVA One-way), seguida pelo teste de Tukey. Foi considerado o nível de significância de 5% (Sokal e Rohlf, 1995). Os dados foram expressos com a média $\pm$ desvio padrão (D.P.) de 12 animais por grupo.

3. Resultados

3.1. Análises sensoriais da geoprópolis de *Melipona fasciculata*

A geoprópolis apresentou-se como fragmentos rígidos de diferentes tamanhos, granulação heterogênea, inodora, sabor amargo e coloração marrom escura.

3.2. Rendimento e abordagem química do EHG de *Melipona fasciculata*

O rendimento do processo extrativo da amostra de geoprópolis de *Melipona fasciculata* obtido por maceração com etanol 70% foi de 2,09%. A abordagem química do extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) indicou ausência de esteroides e grande concentração de substâncias fenólicas, principalmente flavonóides e ácidos fenólicos, substâncias das classes dos triterpenos.

3.3. Determinação da concentração de flavonoides, ácidos fenólicos e fenois totais do EHG de *Melipona fasciculata*

Os teores de flavonoides, ácidos fenólicos e fenois totais encontrados no EHG foram de 3,09%; 9,52% e 12,61%, respectivamente.

3.4. Toxicidade aguda

3.4.1. Investigação da DL₅₀ e alterações comportamentais

Não foram observadas mortes em nenhum dos grupos, não sendo possível o cálculo da dose letal mediana (DL₅₀). Porém, ocorreram algumas alterações comportamentais nos grupos tratados com EHG, em ambos os sexos, como: coçar o focinho e menor mobilidade. Os machos também apresentaram sedação em todos os grupos tratados com o extrato (Tabela 1).

Inserir tabela 1 aqui

3.5. Toxicidade subcrônica

Como não houve diferença significativa nos resultados de toxicidade subcrônica, entre machos e fêmeas, todos os dados foram analisados por grupo, sem levar em consideração o sexo do animal.

3.5.1. Peso corpóreo e dos órgãos vitais

O tratamento subcrônico com EHG não induziu alterações significantes tanto no peso corpóreo final como no peso dos órgãos dos animais (Tabela 2).

Inserir tabela 2 aqui

3.5.2. Análise hematológica e bioquímica

Os resultados da análise hematológica são apresentados na Tabela 3. Os dados mostram que o tratamento subcrônico com EHG, por via oral, não alterou os valores de eritrócitos e plaquetas, mas induziu uma redução na contagem dos leucócitos nos grupos EHG 100 e EHG 200, em relação ao controle, sem alteração na contagem diferencial (linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos).

Em relação à bioquímica, ocorreu significativo aumento na concentração sérica de glicose nos grupos EHG 100 e EHG 200, em relação ao controle. Além disso, houve aumento dos níveis séricos de AST em todos os grupos tratados com EHG e aumento na concentração

de TG e albumina no grupo tratado com a dose de 400 mg/kg. No entanto, o tratamento com EHG nas três doses, induziu diminuição na concentração de ALP (Tabela 4).

Inserir tabelas 3 e 4 aqui

4. Discussão

Geoprópolis de *Melipona fasciculata* mostrou-se inodoro, coloração marrom escura e sabor amargo. Estas características sensoriais também foram observadas no extrato hidroalcoólico, com exceção do odor que apresentou características balsâmicas. Segundo Dutra et al. (2008), a predominância de terra na geoprópolis, é o fator que não permite uma diferenciação sensorial, o que observa-se no extrato, após eliminação da terra. Essa espécie de abelha coleta material resinoso das plantas e o mistura com secreções mandibulares e terra para formar a geoprópolis, o qual é utilizado para assepsia, fechar pequenas frestas e manter a temperatura da colmeia (Nogueira-Neto, 1977).

Os teores de flavonoides (3,09 %) e fenóis totais (12,61%) do EHP medidos por espectrometria do UV apresentaram valores acima do mínimo (0,25% e 0,50%) exigido pela legislação brasileira para a caracterização de qualidade e identidade de extrato hidroalcoólico de própolis de *Apis mellifera* (Brasil, 2001). Levando-se em conta essa legislação, o EHP pode ser considerado com alto teor de compostos fenólicos. Ressalta-se a falta de legislação para a própolis de outras espécies de abelhas. Compostos fenólicos foram detectados em extratos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* (Dutra et al., 2008; Abreu et al., 2006; Bankova et al, 1998) e de outras espécies de *Melipona* (Bankova et al, 1998; Bankova et al, 1999; Kujumgiev et al, 1999; Tomás-Barberan et al, 1993; Greenway et al, 1990)

Os percentuais dos compostos fenólicos, principalmente ácidos fenólicos indicam que essas classes de substâncias contribuem de forma mais acentuada na composição da geoprópolis do que os flavonoides e possivelmente para as atividades biológicas do extrato.

O ensaio de toxicidade aguda, por via oral, com as altas doses estipuladas (1000, 2000 e 4000 mg/kg) do extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) de *Melipona fasciculata* não induziu mortes em nenhum dos grupos, não sendo possível o cálculo da DL₅₀. Nossos estudos mostram que a DL₅₀ para o EHG de *M. fasciculata* está acima de 4000 mg/kg. Esta dose é duas vezes maior que a dose limite para avaliação da toxicidade aguda (2000 mg/kg) (Barros e Davino, 2003). Além disso, o estudo da toxicidade subcrônica, que avaliou o efeito cumulativo do produto, também não induziu morte.

Não foram encontrados trabalhos que avaliem o potencial toxicológico da geoprópolis de *M. fasciculata*, porém trabalhos com a própolis de *A. mellifera* mostram uma baixa toxicidade aguda oral com DL₅₀ acima de 7300 mg/kg em camundongos. Além disso, estudos com múltiplas doses, de 2230 a 4000 mg/kg, por 2 semanas, com extratos etanólicos de própolis brasileira e chinesa, não induziram mortes (Burdock, 1998).

Apesar de não causar morte, o extrato induziu alterações comportamentais nos animais, porém estas permaneceram por, no máximo, quatro horas (Tabela 1). Os primeiros sinais apresentados foram pruridos no focinho dos animais, não sendo, necessariamente, comprovação que o extrato tenha desencadeado algum tipo de hipersensibilidade na mucosa oral ou nasal. Esse comportamento pode significar apenas uma reação de autolimpeza, visto logo após o tratamento, alguns resíduos do extrato ter ficado na parte externa da cavidade oral dos animais.

Arvouet-Grand et al. (1993) mostraram que tanto o extrato como a pomada de própolis de *A. mellifera*, não causam irritações cutâneas. Além disso, já foi verificado que o cafeato de feniletila, composto fenólico presente na própolis de *A. mellifera*, possui efeitos antialérgicos, diminuindo os níveis da imunoglobulina E (IgE) e inibindo a ativação do fator de transcrição NF-κB e liberação do fator ativador de plaquetas (PAF) (Park et al., 2008).

Já a menor mobilidade pode indicar um possível efeito depressor do EHG sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), sendo intensificada com o tempo, levando a um estado de sedação. Estes efeitos podem ser derivados de flavonoides presentes na geoprópolis. Alguns trabalhos relatam que flavonoides presentes em plantas podem ter propriedades sedativas (Kang et al, 2000; Fernández et al, 2004; 2006). Dutra et al. (2008) observaram que amostras de geoprópolis oriundas da Baixada maranhense possuem altos valores de flavonoides. Além disso, a amostra utilizada nestes ensaios apresentou características semelhantes.

Porém, a presença de tais alterações não indica, necessariamente, que o EHG possua efeitos neurotóxicos, pois o efeito foi revertido em no máximo quatro horas. Em contrapartida, tem sido mostrado que alguns flavonoides presentes na própolis de *A. mellifera* possuem efeitos neuroprotetores, principalmente por mecanismos antioxidantes (Kwon et al., 2004; Nakajima et al., 2007).

O sistema hematopoiético é um importante indicador do estado fisiológico e patológico em humanos e animais (Adeneye et al., 2006). A ausência de efeitos nesses parâmetros é indicativa de baixa toxicidade. O estudo comprovou que o EHG não altera os parâmetros hematológicos, exceto uma moderada redução na contagem total de leucócitos nas doses intermediárias, sem modificações na contagem diferencial (Tabela 3), caracterizando uma leucopenia inespecífica (Mariz et al. 2006). Algumas substâncias possuem ação tóxica sobre células hematopoiéticas (Kumar et al., 2003), levando a uma consequente redução das células maduras. Diferente do observado em nosso estudo, tratamentos com doses múltiplas de própolis de *A. mellifera*, diminui o número de eritrócitos (Mohammadzadeh et al., 2007; Jasprica et al., 2007) e não altera o número de leucócitos e plaquetas (Mohammadzadeh et al., 2007). Já Oršolic e Bašić (2005) descreveram um efeito hematoestimulante da própolis, havendo controvérsias no que diz respeito à ação da própolis sobre os parâmetros hematológicos.

Além dos parâmetros hematológicos, substâncias tóxicas podem provocar lesões celulares em órgãos específicos, sendo os mais afetados o fígado e os rins por suas funções de metabolização e excreção, respectivamente.

As transaminases são enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos em alfa ceto ácidos por transferência do grupo amino. Estão amplamente distribuídas nos tecidos, mas principalmente nos músculos e fígado, sendo boas indicadoras da função hepática (Vasconcelos et al., 2007).

Nos hepatócitos, a AST está presente em maior concentração nas mitocôndrias e a ALT no citosol, logo um aumento dos níveis de ALT no sangue e uma não alteração nos valores de AST são indicativos de lesões hepáticas leves (Motta, 2000), assim como foi observado em nossos estudos, sugerindo apenas lesões superficiais (Tabela 4). Em contrapartida, tem sido mostrado que a própolis pode diminuir a concentração sérica destas enzimas, promovendo, muitas vezes, um efeito hepatoprotetor (Nirala e Bhadauria, 2008; Bhadauria et al., 2008).

A baixa intensidade dos danos hepáticos pode ser confirmada quando se observa que o EHG induziu uma diminuição da ALP. No fígado, a ALP está localizada na membrana celular que une a borda sinusoidal das células parenquimais aos canalículos biliares (Motta, 2000), estando sua elevação sanguínea mais relacionada com obstrução biliar extrahepática (Wiwanitkit, 2001). Neste estudo foi observada uma diminuição da ALP em todos os grupos tratados com o EHG, sugerindo um efeito positivo sobre a secreção dos sais biliares.

A diminuição da ALP pode estar relacionada a casos de desnutrição ou deficiência de proteínas. Porém, o tratamento subcrônico com o EHG, não induziu perda de peso corpóreo e promoveu uma elevação na concentração da albumina, proteína sérica presente em maior concentração quando os animais foram tratados com a maior dose. Além disso, tais resultados confirmam que o EHG não provocou graves danos nos hepatócitos. Sendo esta proteína,

fundamentalmente, produzida nos hepatócitos, disfunções hepáticas graves levariam a uma diminuição sérica desta (Santos et al., 2004). Da mesma forma, sendo a uréia um produto sintetizado no fígado a partir da amônia, alterações nos valores deste metabólito, o que não foi observado, seria mais um indicativo de disfunção hepática.

Apesar de poder ser usado como marcador de função hepática este metabólito é mais utilizado para verificar função renal, onde sua elevação no sangue pode estar relacionada a uma disfunção renal, pois esse metabólito não estaria sendo filtrado por este órgão. Os parâmetros analisados indicam que o EHG não induziu efeitos nefrotóxicos.

Além de promover injúrias celulares, algumas substâncias podem alterar o metabolismo das macromoléculas, e dependendo da situação, ser benéfica ou não para o organismo. Neste trabalho foi verificado um aumento na concentração de TG no grupo EHG 400, indicando um possível efeito do EHG sobre o metabolismo lipídico. Além disso, induziu uma elevação na concentração de glicose sanguínea nas duas menores doses. Quando verificado o perfil bioquímico de animais tratados com própolis de *A. mellifera* é observado uma diminuição destes dois metabólitos (Eraslan et al., 2007) sendo tais resultados benéficos em casos de diabetes (Fuliang et. al., 2005). Mais estudos serão realizados para verificar o efeito do EHG sobre o metabolismo destas substâncias.

Em conclusão, os resultados dessa investigação toxicológica mostraram que o extrato hidroalcoólico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* não provoca efeitos toxicológicos agudos graves quando utilizado oralmente, forma de administração geralmente utilizada pela população, pois não induziu mortes e as alterações comportamentais foram rapidamente revertidas. Porém, parece induzir alguma toxicidade hepática, em camundongos, quando administrado subcronicamente.

Este trabalho contribui para os estudos de toxicidade da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith, visando uma maior segurança na utilização deste produto pela população e posterior certificação deste recurso natural.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesses.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de A.S.R., I.C.P.B.S., E.M.S.F. e F.R.F.N. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado para M.J.A.M.A. Ao PET/ SESU/ MEC pela bolsa de A.K.M.A. Ao Banco da Amazônia (BASA) pelo auxílio financeiro (Processo: BASA - 265/ 2006). Ao Sr. Manuel Barros pela doação das amostras de geoprópolis.

Referências

- Abreu, B.V.B., Batista, M.C.A., Azevedo, C.C., Dutra, R.P., Nogueira, A.M.C., Costa, M.C.P., Ribeiro, M.N.S., 2006. Quantificação de polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túbu) coletado no cerrado maranhense. Rev. Ciências da Saúde 8, 18-24.
- Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P., Adeleke, T.I., Bello, S.O., 2006. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats. J. Ethnopharmacol. 105, 374-379.

- Ahn, M.R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.S., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7286-7292.
- Arvouet-Grand, A., Lejeune, B., Bastide, P., Pourrat, A., Legret, P., 1993. Propolis extract. Part 6. Subacute toxicity and cutaneous primary irritation index. *J. Pharm. Belg.* 48, 165-170.
- Bankova, V., Christov, R., Marcucci, M.C., Popov, S., 1998. Constituents of brazilian geopropolis. *Z. Naturforsch.* 53, 402-406.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M.C., Tsvetkova I., Kujumgiev, A. 1999. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* 70, 190-193.
- Bankova, V.B., Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15.
- Bankova, V., Popov, M., 2007. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. *Phcog Rev.* 1, 88-92.
- Barros, S.B.M, Davino, S.C., 2003. Avaliação da Toxicidade. In: S. Oga. *Fundamentos de Toxicologia*. 2. ed. Atheneu, São Paulo, pp. 57-67.
- Bhadauria, M., Nirala, S.K., Shukla, S., 2008. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2703–2712.
- Brasil, 1996. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 116/96. Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterapêuticos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.
- Brasil, 2001. Instrução Normativa nº 3 – anexo VI. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.

- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem. Toxicol. 36, 347-363.
- Castaldo, S., Capasso, F., 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia 73, 1-6.
- Chaillou, L.L., Herrera, H.A., Maidana, J.F., 2004. Estudo de própolis de Santiago del Estero, Argentina. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24, 11-15.
- Dobrowolski, J.W., Vohora, S.B., Sharma, K., Shah, S.A., Naqvi, S.A., Dandiya, P.C., 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. J. Ethnopharmacol. 35, 77-82.
- Duailibe, S.A.C., Gonçalves, A.G., Ahid, F.J.M., 2007. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. J. Appl. Oral Sci 15, 420-423.
- Duran, G., Duran, N., Culha, G., Ozcan, B., Oztas, H., Ozer, B., 2008. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. Parasitol. Res. 102, 1217-1225.
- Dutra, R.P., Nogueira, A.M.C., Marques, R.R.O., Costa, M.C.P., Ribeiro, M.N.S., 2008. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada Maranhense, Brasil. Rev. Bras. Farmacogn. 18, 557-562.
- Eraslan, X.G., Kanbur, M., Silici, S., 2007. Evaluation of propolis effects on some biochemical parameters in rats treated with sodium. Pestic. Biochem. Phys. 88, 73-283.
- Fernández, S., Wasowski, C., Paladini, A.C., Marder, M., 2004. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. Pharmacol. Biochem. Be. 77, 399-404.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Loscalzo, L., Granger, M. R.E., Johnston, G.A.R., Paladini, A.C., Marder, M., 2006. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. Eur. J. Pharmacol. 539, 168-176.

- Freitas, M.O., Ponte, F.A.F., Lima, M.A.S., Silveira, E.R., 2008. Flavonoids and Triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. J. Brazil. Chem. Soc. 19, 532-535.
- Fuliang, H.U., Hepburn, H.R., Xuan, H., Chen, M., Daya, S., Radloff, S.E., 2005. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. Pharmacol. Res. 51, 147–152.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., 2006. Análise de própolis. Ciênc. Tecnol. Aliment. 26, 171-178.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F.R., 1990. The composition and plant origins of propolis. Bee World 71, 107-118.
- Giorgio, S., Ribeiro, M.C.M., Ayres, D.C., 2006. Composições medicamentosas a base de própolis brasileira tipificada com atividade leishmanicida e método de tratamento. BR/SP PI 0601863-7A.
- Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolic-Bubalo, A., Medic-Saric, M., Mayer, L., Romic, Z., Bucan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V., 2007. *In vivo* study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. J. Ethnopharmacol. 110, 548–554.
- Kang, T.H., Jeong, S.J., Kim, N.Y., Higuchi, R., Kim, Y.C., 2000. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizzia julibrissin* Durazz. J. Ethnopharmacol. 71, 321-323.
- Kerr, W. E., 1996. Biologia e manejo da tuiuba: a abelha do Maranhão, EDUFMA, São Luís, MA.
- Kumar, A., Choudhuri, G., Aggarwal, R., 2003. Piperacillin induced bone marrow suppression: a case report. BMC Clinical Pharmacology 3, 1-3.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Yu, Bankova, V., Christov, R. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol. 64, 235-240.

- Kwon, Y.S., Park, D.H., Shin, E.J., Kwon, M.S., Ko, K.H., Kim, W.K., Jhoo, J.H., Jhoo, W.K., W., M.B., Jung, B.D, Kim, H.C., 2004. Antioxidant propolis attenuates kainate-induced neurotoxicity via adenosine A₁ receptor modulation in the rat. *Neurosci. Lett.* 355, 231-235.
- Libério, S.A., Pereira, A.L.A., Araújo, M.J.A.M., Dutra, R.P., Nascimento, F.R.F., Monteiro-Neto, V., Ribeiro, M.N.S., Gonçalves, A.G., Guerra, R.N.M., 2009. The potencial use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J. Ethnopharmacol.*, doi: 10.1016/j.jep.2009.04.047.
- Malone, M.H., 1977. In: *New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological, biological or Therapeutical activity.* Sringer-Verlag, Berlin, pp. 23-53.
- Mani, F., Damasceno, H.C.R., Novelli, E.L.B., Martins, E.A.M., Sforcin, J.M., 2006. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *J. Ethnopharmacol.* 105, 95–98.
- Mariz, S.R., Cerqueira, G.S., Araújo, W.C., Duarte, J.C., Melo, A.F.M., Santos, H.B., Oliveira, K., Melo-Diniz, M.F.F., Medeiros, I.A., 2006. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 372-378.
- Matos, F.J.A., 1997. *Introdução à Fitoquímica Experimental.* 2. ed. Edições UFC, Fortaleza, 141p.
- Menezes, H., 2005. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Instituto Biol.* 72, 405-411.
- Mohammadzadeh, S., Sharriatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N., Ostad, S.N., 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chem.* 103, 1097-1103.

- Motta, V.T., 2003. Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações. 4. ed. Editora Médica Missau, Porto Alegre.
- Moura, E.G., 2004. Agroambientes de Transição: entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. UEMA, São Luís.
- Murad, J.M., Calvi, S.A., Soares, A.M.V.C., Bankova, V., Sforcin, J.M., 2002. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Ethnopharmacol. 79, 331-334.
- Nakajima, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H., 2007. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. Life Sci. 80, 370-377.
- Nirala, S. K., Bhadauria, M., 2008. Synergistic effects of ferritin and propolis in modulation of beryllium induced toxicogenic alterations. Food Chem. Toxicol., doi: 10.1016/j.fct.2008.06.009.
- Nogueira-Neto, P., 1997. A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). Nogueirapes, São Paulo, 445p.
- Oršolic, N., Bašić, I., 2005. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). Biomed. Pharmacother. 59, 561–570.
- Oliveira, R.A.G., 2007. Hemograma: como fazer e interpretar. Livraria Médica Paulista Editora, São Paulo, 544p.
- Padmavathi, R., Senthilnathan, P., Sakthisekaran, D., 2006. Therapeutic effect of propolis and paclitaxel on hepatic phase I and II enzymes and marker enzymes in dimethylbez(a)anthracene-induced breast cancer in female rats. Comp. Biochem. Physiol. 143, 349-354.
- Park, S.G., Lee, D.Y., Seo, S.K., Lee, S.W., Kim, S.K., Jung, W.K., Kang, M.S., Choi, Y.H., Yea, S.S., Choi, I., Choi, I.W., 2008. Evaluation of anti-allergic properties of caffeic acid

- phenethyl ester in a murine model of systemic anaphylaxis. *Toxicol. Appl. Pharm.* 226, 22–29.
- Salatino, A., Teixeira, E.W., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of brazilian propolis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 33-38.
- Santos, N.S.J., Draibe, S.A., Kamimura, M.A., Cuppari, L., 2004. Albumina sérica como marcador nutricional de pacientes em hemodiálise. *Rev. Nutr., Campinas*, 17, 339-349.
- Sforcin, J.M., Fernandes, A., J.R., Lopes, C.A.M., Funari, S.R.C., Bankova, V., 2001. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Venom. Anim. Toxins* 7, 139-144.
- Sforcin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113, 1–14.
- Silveira, F.A., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2002. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. *Composição e Arte*, Belo Horizonte, 253p.
- Simões, C.C., Araújo, D.B., Araújo, R.P.C., 2008. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18, 84-89.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 3rd edition. W. H. Freeman and company, New York, 887p.
- Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F., 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34, 191-196.
- Vasconcelos, T.H.C., Modesto-Filho, J., Diniz, M.F.F.M., Santos, H.B., Aguiar, F.B., Moreira, P.V.L., 2007. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 583-591.

- Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C., 2000. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* 71, 693-696.
- Wiwatitkit, V., 2001. High serum alkaline phosphatase levels, a study in 181 Thai adult hospitalized patients. *BMC Family Practice* 2, 1-4.
- Woisky, R.G.R., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.* 37, 99-105.

Tabela 1

Sinais de toxicidade decorrentes do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) de *Melipona fasciculata*

Grupos ^a	Sexo	Sinais de toxicidade*	Período do evento
Controle	Macho	Nenhum	
	Fêmea	Nenhum	
EHG 1000	Macho	Coçar o focinho, menor mobilidade, sedação	< 4h
	Fêmea	Coçar o focinho, menor mobilidade	< 4h
EHG 2000	Macho	Coçar o focinho, menor mobilidade, sedação	< 4h
	Fêmea	Coçar o focinho, menor mobilidade	< 4h
EHG 4000	Macho	Coçar o focinho, menor mobilidade, sedação	< 4h
	Fêmea	Coçar o focinho, menor mobilidade, sedação	< 4h

^a Camundongos Swiss (n=12/grupo) foram tratados por via oral com doses únicas de EHG (1000, 2000 e 4000 mg/kg) ou solução de DMSO a 1% (controle). Os animais foram observados por 14 dias para identificação de sinais toxicológicos. *Segundo metodologia descrita por Malone (1977).

Tabela 2

Efeito do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) de *Melipona fasciculata* sobre o peso dos órgãos dos camundongos

Órgãos	Grupos			
	Controle	EHG 100	EHG 200	EHG 400
Peso final animal	27.8 ± 3.9 ^a	28.3 ± 3.4	28.5 ± 2.2	28.8 ± 3.7
Fígado	1143.5 ± 124.4	1138.3 ± 139.9	1158.4 ± 92.3	1149.2 ± 121.0
Estômago	406.0 ± 41.9	453.3 ± 100.0	411.6 ± 37.0	444.5 ± 43.4
Intestino	2792.3 ± 296.6	2816.3 ± 337.3	2719.0 ± 214.0	2990.4 ± 293.2
Coração	134.8 ± 20.7	134.6 ± 24.8	137.2 ± 19.3	140.2 ± 12.6
Rim	180.2 ± 39.3	195.6 ± 41.7	190.7 ± 23.4	197.7 ± 38.5

^a Os valores representam a média ± D.P., expresso em g, n=12/ grupo.

Tabela 3

Efeito do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) de *Melipona fasciculata* sobre os parâmetros hematológicos dos camundongos

Parâmetros	Grupos			
	Controle	EHG 100	EHG 200	EHG 400
Eritrócitos ($10^5 / \text{mm}^3$)	98.6 $\pm$ 24.4 ^a	96.3 $\pm$ 15.3	88.9 $\pm$ 12.8	90.8 $\pm$ 21.8
Plaquetas ($10^4 / \text{mm}^3$)	40.9 $\pm$ 11.6	43.9 $\pm$ 9.9	32.6 $\pm$ 4.0	40.6 $\pm$ 4.7
Leucócitos ($10^2 / \text{mm}^3$)	86.1 $\pm$ 7.5	44.8 $\pm$ 12.6*	43.0 $\pm$ 5.5*	68.9 $\pm$ 11.1
Neutrófilos (%)	79.7 $\pm$ 5.6	79.2 $\pm$ 9.0	77.5 $\pm$ 3.6	78.0 $\pm$ 7.5
Linfócitos (%)	20.2 $\pm$ 6.8	16.8 $\pm$ 9.6	22.33 $\pm$ 3.6	24.8 $\pm$ 10.2
Monócitos (%)	0	0	0	0
Eosinófilos (%)	0	0	0	0
Basófilos (%)	0	0	0	0

^a Os valores representam a média $\pm$ D.P. de 12 animais/ grupo.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle, ANOVA, seguida do teste de Tukey.

Tabela 4

Efeito do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) de *Melipona fasciculata* sobre os parâmetros bioquímicos dos camundongos

Parâmetros	Grupos			
	Controle	EHG 100	EHG 200	EHG 400
Glicose (mg/dL)	36.4 ± 17.3 ^a	64.4 ± 30.4*	69.9 ± 21.8*	55.3 ± 11.5
Albumina (g/dL)	2.0 ± 0.3	1.9 ± 0.3	2.1 ± 0.5	2.5 ± 0.2*
Uréia (mg/dL)	60.7 ± 13.6	67.0 ± 17.1	66.9 ± 14.2	67.3 ± 10
AST (U/L)	269.7 ± 37.6	290.7 ± 44.6	272.2 ± 44.9	297.8 ± 24.6
ALT (U/L)	165.3 ± 27.5	202.0 ± 25.8*	200.7 ± 32.4*	208.3 ± 31.8*
ALP (U/L)	9.3 ± 2.0	7.2 ± 1.1*	6.6 ± 1.6*	7.4 ± 1.4*
TG (mg/dL)	118.5 ± 19.9	127.1 ± 29.2	135.5 ± 14.3	148.5 ± 22.4*

^a Os valores representam a média ± D.P. de 12 animais/ grupo. AST=aspartato transaminase, ALT=alanina transaminase, ALP=fosfatase alcalina, TG=triglicérides.

* p < 0,05 em relação ao grupo controle, ANOVA, seguida do teste de Tukey.

DISCUSSÃO

As abelhas da subfamília Meliponinae, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, possuem uma grande diversidade de espécies nas regiões Neotropicais. Mas no estado do Maranhão, muitas espécies encontram-se ameaçadas de extinção, devido a degradação do ambiente por ações humanas, o que vem reduzindo a disponibilidade de árvores para a construção de ninhos (REGO et al., 2008). Além disso, as abelhas buscam nas plantas néctar e pólen para alimentação, e substâncias resinosas e balsâmicas para produção de mel e própolis.

A criação de abelhas indígenas sem ferrão, denominada meliponicultura, possui grande potencial de crescimento no nosso Estado. Esta atividade pode representar uma alternativa ecologicamente correta de geração de renda, aproveitando as abelhas como instrumentos de desenvolvimento sustentável, pesquisa e conservação (REGO et al., 2008).

O estado do Maranhão apresenta extremo grau de pobreza e seu Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é um dos menores do Brasil (PNUD, 2006). Dessa forma, a meliponicultura tem representado uma fonte de renda, pela possibilidade de venda de suas colmeias e produtos. Foi por meio da influência dos povos indígenas maranhenses, que as propriedades terapêuticas dos produtos das abelhas nativas, particularmente a própolis e geoprópolis, foram sendo propagadas ao longo das gerações, fazendo parte da cultura popular do Maranhão. Neste Estado, grande parte da população recorre a produtos naturais, entre eles os de origem apícola, pois o custo de consultar um médico e o preço da medicação está fora dos recursos da maioria das pessoas, principalmente nos municípios mais pobres.

No entanto, segundo Turolla e Nascimento (2006), o uso tradicional de produtos naturais não garante sua segurança, sendo necessária a realização de ensaios toxicológicos pré-clínicos. Neste contexto, os resultados deste trabalho são de extrema importância, pois trazem as primeiras informações toxicológicas para o estabelecimento de parâmetros de segurança e posterior padronização e certificação da própolis e geoprópolis de abelhas nativas.

O estudo toxicológico pré-clínico oral agudo e subcrônico com o extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* (tubi) e com o extrato hidroalcoólico de geoprópolis (EHG) de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) não induziu mortes em nenhum dos grupos. De acordo com Barros e Davino (2003), e

com a portaria nº 116/96 – ANVISA, a dose máxima para avaliação da toxicidade aguda é 2000 mg/kg. Neste estudo, a maior dose administrada foi 4000 mg/kg, ou seja, duas vezes maior que a dose limite, sugerindo que os extratos utilizados possuem baixa toxicidade.

O tratamento agudo com EHP foi mais intenso nas fêmeas tratadas com a maior dose (4000 mg/kg). Por outro lado, o tratamento com EHG nas três doses, teve maior intensidade nos machos, evoluindo para um quadro de sedação.

Estas alterações podem ser indicativas de ação depressora dos extratos sobre o sistema nervoso central e autônomo. No entanto, os efeitos citados não indicam, necessariamente, que o EHP de *S. aff. postica* e o EHG de *M. fasciculata* possuam neurotoxicidade.

O estudo pré-clínico comprovou que o tratamento com EHP de tubi e EHG de tiúba não altera os parâmetros hematológicos, sugerindo que estes extratos não possuem efeito hematotóxico.

Além dos parâmetros hematológicos, em casos de toxicidade, qualquer órgão pode ser o alvo principal, e vários sistemas podem estar envolvidos simultaneamente, mas lesões hepáticas ou renais são mais comuns, devido às funções de metabolização e excreção desses órgãos.

O tratamento agudo e subcrônico com o EHP reduziu os níveis de alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e aspartato transaminase (AST), o que pode estar relacionado com um possível efeito hepatoprotetor. Estes dados corroboram com os resultados de trabalhos realizados com a própolis de *Apis mellifera* (BHADAURIA et al., 2008; NIRALA; BHADAURIA, 2008). Em contrapartida, o tratamento com EHG aumentou os níveis de ALT, mas não alterou os valores de AST, sugerindo apenas lesões hepáticas superficiais.

Além disso, uma redução nos níveis de proteínas do plasma tendem a refletir danos crônicos, o que não foi observado neste estudo, pois no grupo tratado com a dose de 400 mg/kg houve aumento de albumina, sugerindo que o EHG não levou a graves danos hepatocelulares. Segundo Razekh et al. (2008), a determinação de proteínas plasmáticas como a albumina, serve como um critério para avaliação da capacidade de síntese do fígado, já que são sintetizadas nos hepatócitos.

De acordo com Kolankaya et al. (2002), a própolis de *A. mellifera* estimula vários sistemas enzimáticos e o metabolismo celular. Além disso, inibe glicosiltransferases, a atividade da mieloperoxidase, ornitina decarboxilase,

lipoxigenase, proteína tirosina kinase e o metabolismo do ácido aracdônico (BURDOCK, 1998). Os flavonóides presentes na própolis são considerados poderosos antioxidantes, possuindo a capacidade de seqüestrar radicais livres e, portanto, protegendo contra a peroxidação lipídica na membrana celular.

Há relatos de que a própolis de *A. mellifera* baixa a pressão arterial e os níveis de colesterol no sangue (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Nossos estudos mostraram que o tratamento agudo com EHP de tubi não alterou os níveis de colesterol, mas reduziu a concentração de triglicérides no grupo dos machos tratados com a maior dose. Porém, aumentou sua concentração nos machos dos grupos EHP 100 e EHP 200 do tratamento subcrônico, o que pode estar relacionado com a leve esteatose observada no fígado dos animais desses grupos. Além disso, este aumento também foi observado no grupo EHG 400, indicando um possível efeito do EHG sobre o metabolismo lipídico.

CONCLUSÕES

Os resultados da investigação toxicológica pré-clínica aguda e subcrônica com as altas doses estipuladas do EHP de *Scaptotrigona aff. postica* e com o EHG de *Melipona fasciculata*, por via oral, forma de administração geralmente utilizada pela população, não induziu mortes e as alterações orgânicas foram rapidamente revertidas, mostrando que os produtos avaliados possuem baixa toxicidade.

No ensaio toxicológico agudo com EHP, as alterações comportamentais foram mais evidentes nas fêmeas, enquanto no ensaio agudo com EHG, as alterações foram mais intensas nos machos, porém a não persistência das alterações mostra que os extratos não causaram graves efeitos neurotóxicos.

O tratamento agudo com EHP teve efeito hepatoprotetor, em ambos os sexos. Porém, o ensaio com EHG parece induzir alguma toxicidade hepática, em camundongos, quando administrado subcronicamente. Além disso, o tratamento com EHP e EHG, em ambos os sexos, não induziu alterações hematológicas em nenhum dos grupos e não causou efeitos nefrotóxicos, pois não alterou os níveis séricos de uréia e creatinina.

Os resultados deste trabalho podem aumentar a demanda de própolis e geoprópolis no estado do Maranhão, favorecendo a expansão da meliponicultura, contribuindo para o aumento da produtividade, melhorando aspectos sociais, econômicos e ambientais. Além disso, o incentivo da meliponicultura caracteriza o desenvolvimento sustentável frente aos recursos naturais, pois gera renda, trabalho e alimento às famílias. Estas informações certamente desempenharão relevante papel para o estabelecimento do controle de qualidade destes produtos, além de conscientizar a população sobre a importância da conservação de abelhas nativas, valorizando importantes produtos da nossa biodiversidade.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M.J.A.M. **Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona* sp. sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos.** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA, São Luís, 2007.
- ASSUNÇÃO, A.K.M. **Efeito antitumoral do tratamento profilático com extrato hidroalcolico de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith.** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA, São Luís, 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 116/96. **Normas para estudos toxicológicos e da eficácia de produtos fitoterapêuticos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 1996.
- BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da Toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 57-67.
- BHADAURIA, M.; NIRALA, S. K.; SHUKLA, S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2703-2712, 2008.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.
- CARDINALI, S.S.B. As autoras da Biodiversidade. Jornal da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 14 a 20 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.biodiversityreporting.org/index.php>>. Acesso em: 15 fev. 2007.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. 1-6, 2002.
- DUAILIBE, S.A.C.; GONÇALVES, A.G.; AHID, F.J.M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*. **Journal of Applied Oral Science**, v. 15, p. 420-423, 2007.
- DUTRA, R.P.; NOGUEIRA, A.M.C.; MARQUES, R.R.O.; COSTA, M.C.P.; RIBEIRO, M.N.S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith

da Baixada Maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 557-562, 2008.

FARNESI, A.P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos**. Ribeirão Preto, 89f. Dissertação (Programa de pós-graduação em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2007.

FREITAS, B.M. **A vida das abelhas**. Fortaleza: Craveiro e Craveiro – UFC, 1999 (Livro em CD-ROM).

FREITAS, M.O.; PONTE, F.A.F.; LIMA, M.A.S.; SILVEIRA, E.R. Flavonoids and Triterpenes from the nest of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 532-535, 2008.

GOMES, V.A. **Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da própolis de *Melipona compressipis fasciculata* (tiúba)**. Monografia (Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFMA, São Luís, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. Brasil, 2004.

KERR, W.E. Abelhas indígenas brasileiras (Meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. **Informe Agropecuário**, v. 13, p. 15-22, 1987.

KERR, W. E. **Biologia e manejo da tiúba: a abelha do Maranhão**. São Luís: EDUFMA, 1996.

KOLANKAYA, D.; SELMANOGLUA, G.; SORKUNA, K.; SALIHB, B. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. **Food Chemistry**, v. 78, p. 213–217, 2002.

MAIA-FILHO, E.M.; MAIA, C.C.R.; BASTOS, A.C.S.C.; NOVAIS, T.M.G. Efeito antimicrobiano *in vitro* de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 56, p. 21-25, 2008.

MOURA, E.G. **Agroambientes de Transição: entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil**. São Luís: UEMA, 2004.

- NIRALA, S.K.; BHADAURIA, M. Synergistic effects of ferritin and propolis in modulation of beryllium induced toxicogenic alterations. **Food and Chemical Toxicology**, 2008. doi: 10.1016/j.fct. 2008.06.009.
- NOGUEIRA, A.M.C. **Determinação de caracteres físicos, químicos e físico-químicos de amostras de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) e própolis de *Scaptotrigona* sp. (tubi) cultivadas em municípios do cerrado maranhense.** São Luís, 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - UFMA, São Luís-MA, 2008.
- NOGUEIRA-NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão.** São Paulo: Nogueirapis, 1997, 446p.
- OLIVEIRA, E.G.; COSTA, M.C.P.; NASCIMENTO, A.R.; MONTEIRO NETO, V. Qualidade microbiológica do mel de *Melipona compressipes fasciculata* produzido no estado do Maranhão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 92-99, 2005.
- PNUD. **Atlas de desenvolvimento humano no Brasil.** Software, Versão 1.0.0. 2006. Disponível em: www.pnud.org.br/idh.
- RASEKH, H.R.; NAZARI, P.; KAMLI-NEJAD, M.; HOSSEINZADEH, L. Acute and subchronic oral toxicity of Galega officinalis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 21-26, 2008.
- RÊGO, M.M.C.; ALBUQUERQUE, P.M.C.; VENTURIERI, G. Menos locais para ninhos. **Ciência Hoje**, p. 50 - 51, 2008.
- SANTOS, G.M.; ANTONINI, Y. The traditional knowledge on stingless bees (Apidae: Meliponina) used by the Enawene-Nawe tribe in western Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, p. 1-9, 2008.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação.** Belo Horizonte: Composição e Arte, 2002. 253p.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.

Anexos

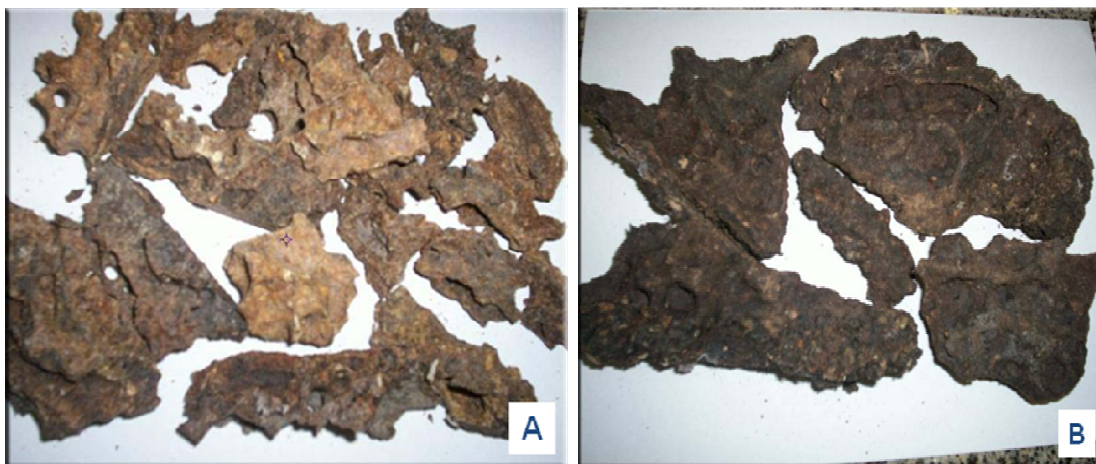
Anexo 1: Vista lateral das abelhas *Scaptotrigona* aff. *postica* (tubi) (A) e *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) (B).



Anexo 2: Meliponário da abelha tubi em Barra do Corda - MA (A) e da abelha tiúba em Palmeirândia - MA (B).



Anexo 3: Própolis da abelha tubi (A) e geoprópolis da abelha tiúba (B).



Anexo 4: Tabela de sinais de toxicidade aguda (14 dias), de acordo com Malone (1977).

AÇÃO/PARÂMETROS	controle	5'	10'	20'	30'	60	4h	8h	24h
> motilidade									
> Frequência Respiratória									
Piloereção									
Exolftalmia									
Movimentos									
Lamber patas									
Coçar focinho									
Morder cauda									
Convulsão Clônica									
Convulsão Tônica									
Tremores Finos									
Tremores Grosseiros									
Sialorréia									
Fasciculações									
Ereção da cauda									
Tremor da cauda									
Diâmetro pupilar									
< motilidade									
< Frequência Respiratória									
Sedação									
Catatonía									
Ptose Palpebral									
Analgesia									
Anestesia									
Perda de Ref.Corneano									
Diâmetro Pupilar									
Ataxia									
Dispneia									
Passividade									
Alienação ambiente									
< Tonus dorsal									
Perda preensão pata									
Paralisia trem poste									
Palidez									
Cianose									
Hiperemia									
Diarréia									
Contorção									
Reação de fuga									
Agressividade									
Granidos									

Anexo 5: Laudos realizados no Laboratório de Histologia da Universidade Federal do Maranhão, pelo Dr. Adelson de Souza Lopes.

EXPERIMENTO: Toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* (doses: 1000, 2000 e 4000 mg/ kg)

Nº DE LÂMINAS/GRUPO: 6

IDENTIFICAÇÃO: Laboratório de Histologia, em microscópio óptico de luz comum, com objetivas de 10 e 40

GRUPOS: Controle, EHP 1000, EHP 2000 e EHP 4000

SEXO DOS ANIMAIS: Fêmeas (♀)

FOTOGRAFIAS: em fotomicroscópio (Olympus PM-104K3), com aumento de 400x

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (TOXICIDADE)

ÓRGÃO: Fígado

Parâmetros analisados	Controle	EHP 1000	EHP 2000	EHP 4000
Aspecto geral	Normal	Normal	Alteração +	Normal
Infiltrado gorduroso	-	-	-	-
Infiltrado leucocitário	-	-	+	-
Vasos congestos	-	-	-	-
Hemorragia	-	-	-	-
Figuras de mitose	-	-	-	-
Vascularização	-	-	-	-
Necrose	-	-	-	-
Degeneração tecidual	-	-	-	-

Ausência : - Presença : + Leve : + Moderado : + + Intenso: + + +

RESPONSÁVEL PELO LAUDO

EXPERIMENTO: Toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* (doses: 1000, 2000 e 4000 mg/ kg)

Nº DE LÂMINAS/GRUPO: 6

IDENTIFICAÇÃO: Laboratório de Histologia, em microscópio óptico de luz comum, com objetivas de 10 e 40

GRUPOS: Controle, EHP 1000, EHP 2000 e EHP 4000

SEXO DOS ANIMAIS: Machos (♂)

FOTOGRAFIAS: em fotomicroscópio (Olympus PM-104K3), com aumento de 400x

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (TOXICIDADE)

ÓRGÃO: Fígado

Parâmetros analisados	Controle	EHP 1000	EHP 2000	EHP 4000
Aspecto geral	Normal	Alteração	Normal	Normal
Infiltrado gorduroso	-	-	-	-
Infiltrado leucocitário	-	+	-	-
Vasos congestos	-	-	-	-
Hemorragia	-	-	-	-
Figuras de mitose	-	-	-	-
Vascularização	-	-	-	-
Necrose	-	-	-	-
Degeneração tecidual	-	-	-	-

Ausência : - Presença : + Leve : + Moderado : ++ Intenso: +++

RESPONSÁVEL PELO LAUDO

EXPERIMENTO: Toxicidade subcrônica do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* (doses: 100, 200 e 400 mg/ kg)

Nº DE LÂMINAS/GRUPO: 6

IDENTIFICAÇÃO: Laboratório de Histologia, em microscópio óptico de luz comum, com objetivas de 10 e 40

GRUPOS: Controle, EHP 100, EHP 200 e EHP 400

SEXO DOS ANIMAIS: Machos (♂)

FOTOGRAFIAS: em fotomicroscópio (Olympus PM-104K3), com aumento de 400x

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (TOXICIDADE)

ÓRGÃO: Fígado

Parâmetros analisados	Controle	EHP 100	EHP 200	EHP 400
Aspecto geral	Normal	Alteração	Alteração	Normal
Infiltrado gorduroso	-	+	+	-
Infiltrado leucocitário	-	-	-	-
Vasos congestos	-	-	-	-
Hemorragia	-	-	-	-
Figuras de mitose	-	-	-	-
Vascularização	-	-	-	-
Necrose	-	-	-	-
Degeneração tecidual	-	-	-	-

Ausência : - Presença : + Leve : + Moderado : + + Intenso: + + +

RESPONSÁVEL PELO LAUDO

EXPERIMENTO: Toxicidade subcrônica do extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) de *Scaptotrigona aff. postica* (doses: 100, 200 e 400 mg/ kg)

Nº DE LÂMINAS/GRUPO: 6

IDENTIFICAÇÃO: Laboratório de Histologia, em microscópio óptico de luz comum, com objetivas de 10 e 40

GRUPOS: Controle, EHP 100, EHP 200 e EHP 400

SEXO DOS ANIMAIS: Fêmeas (♀)

FOTOGRAFIAS: em fotomicroscópio (Olympus PM-104K3), com aumento de 400x

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (TOXICIDADE)

ÓRGÃO: Fígado

Parâmetros analisados	Controle	EHP 100	EHP 200	EHP 400
Aspecto geral	Normal	Alteração	Normal	Alteração
Infiltrado gorduroso	-	+	-	+
Infiltrado leucocitário	-	-	-	++
Vasos congestos	-	-	-	-
Hemorragia	-	-	-	-
Figuras de mitose	-	-	-	-
Vascularização	-	-	-	-
Necrose	-	-	-	-
Degeneração tecidual	-	-	-	-

Ausência : - Presença : + Leve : + Moderado : + + Intenso: + + +

RESPONSÁVEL PELO LAUDO

Anexo 6: Normas para publicação de manuscritos nos seguintes periódicos: Journal of Ethnopharmacology e Food and Chemical Toxicology.

I. Scope of the journal

The Journal of Ethnopharmacology is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on materia medica. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's Ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the documentation of indigenous medical knowledge, scientific study of indigenous medicines in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The Journal of Ethnopharmacology publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an ethnopharmacological, an ethnobotanical or an ethnochemical approach to the study of indigenous drugs. Reports of anthropological and ethnobotanical field studies fall within the journal's scope. Studies involving pharmacological and toxicological mechanisms of action are especially welcome. Clinical studies on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems.

The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only. All reviews and commentaries are fully peer-reviewed. Potential authors are strongly encouraged to contact the Reviews Editor jethnopharmacol@pharmacy.ac.uk prior to writing a review. A one-page outline and a short C.V. of the (senior) author should also be included.

THE "RULES OF 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work.

II. Preparation of manuscripts

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

Contributions are accepted on the understanding that the authors have obtained the necessary authority for publication. Submission of multi-authored manuscripts implies the consent of each of the authors. The publisher will assume that the senior or corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the article to this journal. Submission of an article is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the author(s) permission to publish his/her article in this journal implies the exclusive authorization to the publisher to deal with all issues concerning copyright therein. Further information on copyright can be found on the Elsevier website.

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

1. Manuscript types

The Journal of Ethnopharmacology will accept the following contributions:

Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.

Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.

Letters to the Editors;

Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.

Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.

Commentaries - invited, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the Journal of Ethnopharmacology. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words.

Conference announcements and news

2. General procedures

The language of the Journal is English. Manuscripts should be neatly typed, double-spaced throughout, including tables, on pages of uniform size with at least 2.5 cm margins on all sides. Use one font type and size throughout the manuscript. Author(s) should not break or hyphenate words. When using an electronic printer, the right-hand margin should not be justified. Footnotes in text are not permitted. The text of the manuscript must be paginated, the first page being the title page. The manuscript, typed with double spacing and ample margins, should be submitted with a cover letter (containing the declaration that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights and a clear explanation of the ethnopharmacological importance of the study) and a completed Author Checklist. The following format and order of presentation is suggested.

2.1. Title, author(s), address(es)

The title should be no longer than 100 letters, including spaces. Initials or first and middle names followed by last name of the author or authors must be given (not last name followed by initials). If there are two or more authors with different addresses, use a superscripted letter (a, b, c etc.), not a number, at the end of the last name of each author to indicate his/her corresponding address. The full address of the corresponding author (the way the author wishes to be contacted) should be provided. The corresponding (usually, the senior) author, to whom correspondence and proofs will be sent, must be indicated by an asterisk and footnoted, and in the footnote, his/her

the telephone and fax numbers, and e-mail address must be indicated. Address(es) should be underlined or italicised.

2.2. Abstract

The abstract should be structured with five sub-headings: Ethnopharmacological relevance; Aim of the Study; Materials and Methods; Results; Conclusions. The text should not exceed 200 words and has to be presented at the beginning of the paper. Unsubstantiated speculation should not be included. Footnotes may not be used. References, if cited, must provide complete publication data.

2.3. Text layout

The text of a research paper should be divided into the following headings: Introduction, Methodology (or Materials and Methods), Results, and Discussion and conclusions. Each heading (and subheading) must be numbered using the convention established in the journal. Acknowledgements should come after Discussion and conclusions and before References; Acknowledgements and References are not to be numbered. Headings must be bold-faced and written in an upper-and-lower case style [not in caps], while subheadings should be underlined or italicised. Tables and figures are to be placed at the end of the text, after References. Authors are required to include: (i) the chemical structure, formula and proprietary name of novel or ill-defined compounds; (ii) the w/w yield of prepared extracts in terms of starting crude material; (iii) complete formulation details of all crude drug mixtures; (iv) the voucher herbarium specimen number of the plant(s) studied in case of less well known plants, cited using the collector and collection number (e.g., Doe 123), and indicating the name of the herbarium institution where it has been deposited. All plant materials must be fully identified as in the following illustration: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don f. *albus* Pich. (Apocynaceae) as authenticated by Dr. John Doe, Department of Botany, University of Connecticut.

2.4. Guidelines for Plant and Animal Names

All scientific names (Latin binomials) must be underlined or italicised throughout the text and in the tables and figures. For plant and animal species, full or complete scientific names, genus-species and the correct authority citation, must be used, when that name appears for the first time in text. The authority citation may be dropped in subsequent mention of that name throughout the text. The family name must follow the scientific name in parentheses when the name appears for the first time in the text. Full scientific names and the family name of the subject plants/animals must be used in the Abstract. Synonyms must be indicated in parentheses and preceded by the word "syn." followed by a colon. Authors are advised to consult the International Plant Name Index (IPNI) (<http://www.ipni.org>) and W3Tropicos (<http://www.mobot.org>) web-based databases to determine the correct spelling of full plant scientific names. Generic names may be abbreviated (e.g., *C. roseus* for *Catharanthus roseus*), provided such practice does not lead to confusion; generic names, however, must not be abbreviated when the name appears for the first time in the text. Specific epithets must never be abbreviated; thus, the use of *Catharanthus r.* is not allowed.

2.5. Keywords

Authors are requested to assign 3-6 keywords to the manuscript, preferably taken from Index Medicus or Excerpta Medica Index, for abstracting and indexing purposes. These keywords should be typed at the end of the Abstract. Each keyword should start with a capital letter and be separated from each other by a semi-colon.

2.6. Tables, illustrations and graphs

Tables should be on separate sheets, one table per sheet, and should bear a short descriptive title. Footnotes in tables should be indicated by consecutive superscript letters, not numbers.

Figures should be original ink drawings, photographs or computer drawn figures in the original, and of high quality, ready for direct reproduction. Xerox copies are unacceptable as they give unsatisfactory results after final printing. Figures should be drawn in such a way that they can be reduced to 8 cm in width (i.e., the column width); in exceptional cases a reduction to a width of 17.5 cm will be allowed. All lettering should be such that height of 1.2-1.5mm (minimum) of numbers and capital letters results after reduction. Numerical scales, scale and curve legends, and all other lettering within the figure itself should be drawn with a lettering guide (stencil) or should be done using stripleters (Letraset, etc). All figures should have captions. Each figure should be identified in the margin or at the back in a corner with the name of the author and the figure number. The figure captions should be on a separate sheet. One set of original drawings is required.

Colour illustrations should be submitted as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the total cost from Elsevier after receipt of your accepted article. The 2006 price for color figures is EUR 285 for the first page and EUR 191 for subsequent pages.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

2.7. References

References should be referred to by name and year (Harvard system) chronologically in the text (e.g.: Brown and Penry, 1973; Stuart, 1979; Ageel et al., 1987) and listed alphabetically at the end of the paper. No ampersand should be used and the words "et al." should not be underlined or italicized. Only papers and books that have been published or in press may be cited.

For papers in press, please cite the DOI article identifier. The Digital Object Identifier (DOI) is a persistent identifier which may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The DOI will never change. Therefore, it is an ideal medium for citing Articles in Press, which have not yet received their full bibliographic information. Unpublished manuscripts or manuscripts submitted to a journal but which have not been accepted may not be cited. Journal and book titles should not be underlined or italicised and should be given in full in the reference list, with no underline or italics.

Examples:

Journals:

Britton, E.B., 1984. A pointer to a new hallucinogen of insect origin. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 331-333.

Books: Emboden, W., 1972. *Narcotic Plants*. Studio Vista, London, p. 24.

Multiauthor Books:

Farnsworth, N.R., 1988. Screening plants for new medicines. In: E.O. Wilson and F.M. Peter (Eds.), *Biodiversity*, National Academy Press, Washington, D.C., pp. 83-97.

Ethnopharmacological Communications (formerly short communications) are brief contributions on:

- isolation of biological active compound(s) from a traditional medicine,
- screening of a series traditional medicines for biological activity,
- study on a pharmacological activity of a traditional medicine,
- study on the toxicology of a traditional medicine.

Food and Chemical Toxicology

Impact Factor: 2.186

General Information: *Food and Chemical Toxicology* publishes papers that fulfil the views as laid down in the Aims and Scope section. The Journal's main purpose is the publication of papers reporting and interpreting original unpublished toxicological research, particularly studies promoting an understanding of the mechanisms underlying toxic effects or improvements in methods for predicting adverse effects. Papers reporting the toxicological examination of specific foods, chemicals or consumer products will be published, irrespective of the positive or negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of acceptability. In addition, Brief Communications (see description below) will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that they describe original research performed by authors, that all authors approve of the submission, and that the manuscript is not being considered for publication elsewhere. By submitting the manuscript, the authors agree that, if accepted for publication, copyright of the complete article will be assigned to the publisher.

Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects, and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

Conflict of Interest and Source of Funding. A conflict of interest exists when an author or the author's institution has a financial or other relationship with other people or organizations that may inappropriately influence the author's actions. All submissions to *Food and Chemical Toxicology* must include disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. *Food and Chemical Toxicology* may use such information as a basis for editorial decisions and may publish such disclosures if they are believed to be important to readers in judging the article.

Conflict of Interest Statements for Authors. *Food and Chemical Toxicology* requires full disclosure of all potential conflicts of interest.

Please download the disclosure from the *Food and Chemical Toxicology* web site, <http://ees.elsevier.com/fct> at the 'Attach Files' stage of manuscript submission or download the form directly [here](#). The corresponding author is responsible for downloading and sharing a copy of this form for each and every co-author listed on the manuscript. Each and every co-author must complete and sign their individual form and return to the corresponding author. The corresponding author is responsible for uploading their form and those of their co-authors (as one document) at the submission process.

Investigators should disclose potential conflicts to participants in clinical trials and other studies and should state in the manuscript whether they have done so. *Food and Chemical Toxicology* may decide not to publish on the basis of a declared conflict, such as the financial interest of an author in a company (or its competitors) that makes a product discussed in the paper.

Submission of Manuscripts. It is a condition of publication that all manuscripts must be submitted in English to *Food and Chemical Toxicology's* submission and review website, <http://ees.elsevier.com/fct>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to five individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers. Should you be unable to provide an electronic version, please contact the editorial offices prior to submission:

Managing Editor for North, Central and South America: Joseph F. Borzelleca
josephfborzelleca@comcast.net

Managing Editor for rest of the World: Alan Boobis a.boobis@ic.ac.uk

Brief Communications

Preliminary but exciting break-through findings may be published in this expedited review process. This manuscript must be limited to eight double-spaced pages and generally follow the same format as full papers. The need for rapid publication of the data must be clearly stated in the Introduction. Brevity is not a justification for Brief Communication status.

Reviews

Informative reviews of contemporary topics in toxicology relevant to the scope of the journal are welcomed. They should be concise and, in any event, no longer than 80 pages double-spaced, including references, table and figures. Authors should follow the general advice given above for manuscripts, but reviews do not need to follow the sectional format recommended for research papers. Reviews should include a Title page, Abstract, Introduction and Discussion/Conclusions, in addition to the core of the review. A contents page is not necessary unless the author(s) consider that would be helpful in a lengthy review.

Manuscript Format

Manuscripts should be written in clear and concise English; incomprehensible manuscripts will be returned to the authors for rewriting. Manuscripts should be double spaced throughout, with at least 2.5-cm margins. All pages must be numbered, including the title page.

Title page:

- Title: Titles consisting of declarative or interrogative sentences are not acceptable. Titles may not include trademarked names or abbreviations;
- Authors: Provide surnames and initials of all authors;
- Institution(s) where the work was done (with the affiliation of each author clearly indicated);
- Corresponding author: Provide full name and complete contact information including mailing address, telephone number, fax number and email;

- Running title: This will be printed at the top of each page of the manuscript; not to exceed 45 characters including spaces;
- Keywords: Please provide no more than six keywords;
- Abbreviations: Any abbreviations used should be listed in alphabetical order under Abbreviations as a footnote to the title page.

Abstract

The abstract should be a self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

Introduction

Provide a concise and clear statement on the background, purposes and significance of the work including objectives.

Materials and Methods

This section should be a description of the experimental design and of any new or improved methods. Provide sufficient detail such that experienced researchers would be able to duplicate the experiments. Well established methods and techniques may be identified by reference only.

Test substances must be adequately characterized and should include chemical name, CAS registry Number, EU Number, common or usual name and purity. If the test substance is an extract, the following information must be provided: scientific and common name of the source, detailed extraction procedure, concentration of active principle(s) (if known), standardization of batches, and stability. Details are necessary to permit clear identification and to allow replication of results by other investigators.

Animals must be specified by species, strain, sex, age, weight (mean $\pm$ SD or SE), housing conditions and number per group.

It is recommended but not required that safety evaluation studies that conform to recognized existing guidelines (e.g. OECD) and follow GLP or GCP procedures should be so noted.

Results

Should be presented concisely, with the aid of tables or figures where appropriate. Tables should include indications of statistical significance. Duplication between this section and the Discussion must be avoided.

Discussion

A succinct interpretation of the data. Appropriate speculation and a brief discussion of further research are encouraged but must be brief. Extensive literature reviews and highly speculative comment are discouraged.

Acknowledgements

Provide recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted. All sources of funding (for example, contracts, grants, bequests and/or agencies) supporting the work are to be declared.

Tables and Figures

Each Figure should be in one of the following preferred formats: Tiff, JPEG, PDF, and EPS. Please refer to <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for detailed instructions on preparing electronic artwork.

These must be intelligible without reference to the text and should be planned to fit the page size of the Journal. Authors should indicate in the text where they would prefer each table and figure to appear (e.g. <Insert table 1 here>). Tables and figures should be numbered, in arabic numerals, in the sequence in which they are mentioned in the text. The same data may not be reproduced in both a table and a figure. Each table must have a title and on each column there should be a heading that clearly identifies the data therein. Data should be expressed as mean $\pm$ SE or SD, and noted as such. Tables consisting of negative data only (no statistically significant dose-dependent effects) are strongly discouraged. Illustrations and diagrams should be avoided. For figures, no information that can be included in the legend should appear on the figure. The following standard symbols are preferred for line drawings: (closed triangle), (open triangle), (closed circle), (open circle), (circle with dot), (closed box), (square), (open box), (x), (diamond). The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification. If figures that have already been published under copyright are to be reproduced in the Journal (e.g. in reviews), copies of letters from the first publisher and the original author giving permission for such reproduction must always accompany the submitted manuscript.

Footnotes

These should include the definitions of any abbreviations used in the text and any author's current address, if different from that given below the title. Other footnotes, as distinct from literature references, should be avoided in the text as far as possible. When they are essential, they should be identified by superscript numbers. All the footnotes except those for tables should be printed on a separate sheet, with an indication of the manuscript page to which the footnote refers.

Nomenclature

All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to be their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs. **Gene accession numbers** In the electronic version of a published manuscript, gene accession numbers will be linked directly to the gene's description in NCBI's Nucleotide sequence database. The accession number should be formatted as follows: Accession no. AJ315850 and in the text e.g. ". . ." at the amino acid sequence level to the human IDN3 gene (Accession No. AJ315850)."

The production department will then link this reference when they find it in the text. Authors should DOUBLE-CHECK the number they use to make absolutely sure that it is correct before referring to it in their paper. Accession numbers in proofs should also always be checked for correctness. The number is an essential part of the link.

Abbreviations

These should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title page (see above).

Preparation of Supplementary Material: Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/authors>.

References should be cited in the text by the authors' names and year of publication (Harvard system).

- For books: authors' names and initials, year of publication, title of article, title of book preceded by 'In:', first and last page numbers.
- For edited volumes: Initial(s) and name(s), followed by '(Eds)', publisher's name and city, then first and last page numbers. Reference to a work by more than two authors should give the name of the first author only followed by 'et al.'
- References cited in the text should be given at the end of the paper, arranged in alphabetical order of first author. Citations must include names and initials of all authors, year, full title of paper, abbreviated title of periodical, and volume and first and last page numbers.
- More than one paper from the same author(s) in the same year should be identified by the letters a,b,c, etc., after the year of publication.

Examples:

- Pereira, M.A. and Chang, L.W., 1981. Binding of chemical carcinogens and mutagens to rat hemoglobin. *Chem.- Biol. Interact.* 22, 301-305.
- Weisburger, E.K., 1988. Carcinogenic halogenated aliphatic compounds. In: P. Politzer and F.J. Martin, Jr. (Eds), *Chemical Carcinogens. Activation Mechanisms, Structural and Electronic Factors, and Reactivity*, Elsevier, Amsterdam, pp. 91-113.

English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

Proofs, Reprints and Author Inquiries: One set of proofs of accepted manuscripts will be sent to the corresponding author. No alteration of the substance of the text,

tables or figures will be allowed at this stage. Corrected proofs should be returned to the publisher within two days of receipt. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional offprints can be ordered by the author. Offprint requests after publication will be subject to an extra charge.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy. Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Authors' rights:

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use;
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server);
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites;
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com);
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to delegates attending such a meeting;
- for your employer, if the article is a 'work for hire,' made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g. training);
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article;
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially);
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal);

- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication to the journal.

Author enquiries:

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available), please visit <http://www.elsevier.com/authors>.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication.

Authors of *Food and Chemical Toxicology* please note: there is no page charge for this journal. The cost of printed colour pages will be the responsibility of the author(s), please note all illustrations are reproduced in colour on ScienceDirect.

Sponsored Articles:

Food and Chemical Toxicology offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please click [here](#).