

EDILSON JOSÉ ZAFALON

**AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTOXICIDADE SOBRE
CÉLULAS ÍNTEGRAS E TUMORAIS DA APIGENINA E TT-
FARNESOL**

CAMPO GRANDE
2012

EDILSON JOSÉ ZAFALON

**AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTOXICIDADE SOBRE
CÉLULAS ÍNTEGRAS E TUMORAIS DA APIGENINA E TT-
FARNESOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Zárate.

CAMPO GRANDE
2012

EDILSON JOSÉ ZAFALON

**AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E CITOTOXICIDADE SOBRE
CÉLULAS ÍNTEGRAS E TUMORAIS DA APIGENINA E TT-
FARNESOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de doutor.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Zárate (orientador)
Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho/UFMS

Prof^a. Dr^a. Susana Elisa Moreno
Universidade Católica Dom Bosco (UCDB)

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Borsatti
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP)

Prof^a. Dr^a. Rosana Mara Giordano de Barros
Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho/UFMS

Prof. Dr. José Luiz Guimarães de Figueiredo
Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho/UFMS

*Dedico aos meus queridos pais **Valdióres José Zafalon** e **Darci Bassini Zafalon**,
que em todos os meus momentos de dificuldades estavam sempre me incentivando
e orientando a trilhar os melhores caminhos. A educação que me proporcionaram
é o tesouro mais precioso que alguém possa ter.*

*Para minha amada esposa **Andrea** e meu querido filho **Lucas**, por me tornarem
uma pessoa muito mais feliz!*

*Aos meus irmãos **Ana**, **Nilton**, **Silvana** e **Hederson**, pelos exemplos de carinho,
honestidade, coragem e caráter.*

Dedico a vocês, mais essa vitória no decorrer de minha vida!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço a Deus por tudo que me ocorreu até este momento, dificuldades e obstáculos fazem parte do caminhar... rogo a Ti para que me dê a sabedoria necessária para perseverar na Fé!

À Nossa Senhora, mãe do céu e intercessora, que passou muitas vezes na frente!

Minha comunicação com Deus é um pouco diferente! Quando peço algo ou alguma coisa, Deus me envia pessoas...

E é nesse momento que agradeço, não somente ao meu orientador, mas, principalmente, ao grande amigo Paulo Zárate. Sua idoneidade, honestidade, força e caráter são características de pessoas que buscam um bem comum. Por isso, a admiração e os agradecimentos!

Não poderia deixar de agradecer, também especialmente, uma mulher corajosa, de grande personalidade e, acima de tudo, uma cristã! Que acreditou e me deu a oportunidade do primeiro passo efetivo na carreira da docência, Prof^{ta}. Cibele!

Essas pessoas, ou melhor, essa família foi enviada por Deus quando em minhas orações!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Susana Moreno pela simplicidade, conhecimento, atenção, educação, tranquilidade, paciência, enfim, são muitos os adjetivos. Esse trabalho só foi concretizado pelo seu aceite, portanto, agradeço profundamente sua dedicação à pesquisa.

Aos pesquisadores e também amigos, que de forma especial, entraram na minha vida: Danieli, Brunna, Ana Paula, Fred e Vinícius, pessoas com as quais aprendi muito e que, tenho certeza, terão uma carreira brilhante na pesquisa. Sem vocês, esse trabalho não teria acontecido. Muito obrigado!

Aos meus amigos professores Alessandro, Key, Rosana e Valéria, pelo companheirismo no dia a dia da Faculdade. Pelas conversas e apoio dado para transpor os obstáculos.

Ao meu irmão Hederson, que me ajudou, tão prontamente, quando pedi seu auxílio. Peço a Deus que seja ainda mais feliz com a Fabiana e o Mateus.

Aos professores Teófilo Mazon, pela ajuda e disponibilidade do laboratório.

Ao amigo Achilles Parma Neto, pela ajuda clínica no momento do experimento.

Aos professores da graduação, colegas de serviço, e aos professores da Pós-graduação que contribuíram para a minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-oeste pela oportunidade.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, local que escolhi e que faz parte do meu desenvolvimento.

À Universidade Católica Dom Bosco, pelo apoio fundamental e efetivo na realização desse trabalho. Pela estrutura proporcionada e o incentivo ao ensino e à pesquisa.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho, pela parceria criada.

A todos aqueles que não citei, mas que de uma forma ou de outra, colaboraram na realização desse trabalho. Muito obrigado!

*Faço das minhas palavras e agradecimentos, as palavras de Irmã Dulce:
“Agradeço toda a colaboração e ajuda que me deram. Desculpem e perdoem os meus erros e as minhas faltas!”*

“Tudo posso Naquele que me fortalece.”
Filipenses 4:13

RESUMO

Zafalon EJ. Ação anti-inflamatória e citotoxicidade sobre células íntegras e tumorais da apigenina e tt-farnesol. Campo Grande; 2012. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

Os produtos naturais e seus derivados são fontes inesgotáveis de agentes terapêuticos. A própolis e seus componentes participam desse contexto, em especial, a apigenina e o tt-farnesol, dois importantes flavonoides/terpenoides presentes no extrato. Embora investigações tenham demonstrado a ação anti-inflamatória do extrato de própolis, não há relatos dessa atividade em seus componentes, quando avaliados isoladamente. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade anti-inflamatória e a citotoxicidade da apigenina e do tt-farnesol, isolados e em associação. A amostra foi constituída de 90 camundongos *Swiss*. A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelos modelos de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal ($n=60$) e edema de pata ($n=30$). A citotoxicidade foi avaliada pelo teste de viabilidade celular em macrófagos e em células tumorais. A análise estatística foi realizada pela ANOVA e pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Em relação à migração de neutrófilos, os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, exceto para os animais que receberam dexametasona e a associação apigenina + tt-farnesol. Nesses dois grupos, a contagem de neutrófilos foi significativamente menor que os demais ($p<0,001$). Sobre o teste do edema de pata, em nenhum dos tempos avaliados houve diferença significativa entre os grupos experimentais, com exceção do tempo de 240 minutos, quando o edema de pata dos animais do grupo tt-farnesol + apigenina e do grupo dexametasona (controle positivo) foi significativamente menor do que observado no grupo apigenina 100 μL ($p<0,05$). Os camundongos que receberam dexametasona foram os únicos que não apresentaram diferença de edema entre os tempos de análise ($p=0,072$). Na avaliação da citotoxicidade/viabilidade celular, verificou-se que as células mantiveram-se viáveis nos três tempos experimentais (24, 48 e 72 horas), apresentando uma menor atividade mitocondrial no tempo de 24 horas para as células íntegras. Em relação às células tumorais, observou-se redução da viabilidade celular nos mesmos tempos. Concluiu-se que há atividade anti-inflamatória das substâncias quando aplicadas isoladamente, porém, apresentam maior expressão quando associadas; além disso, tanto a apigenina quanto o tt-farnesol não são citotóxicos para as células íntegras, visto a manutenção positiva da viabilidade celular, o que não foi observado para as células tumorais.

Palavras-chave: flavonoides, sobrevivência celular, anti-inflamatórios.

ABSTRACT

Zafalon EJ. Anti-inflammatory action and cytotoxicity on normal cells and tumors of apigenin and tt-farnesol. Campo Grande; 2012. [Thesis – Federal University of Mato Grosso do Sul].

Natural products and derivatives are inexhaustible sources of therapeutic agents. The propolis and its components participating in this context, in particular, apigenin and tt-farnesol, two important flavonoids / terpenoids present in the extract. Although investigations have shown anti-inflammatory action of propolis extract, there are no reports of this activity into its components, when evaluated separately. Therefore, the aim of this study was to assess anti-inflammatory and cytotoxicity of apigenin and tt-farnesol, alone and in combination. The sample consisted of 90 mice. The anti-inflammatory activity was evaluated by the models of neutrophil migration into the peritoneal cavity ($n = 60$) and paw edema ($n = 30$). Cytotoxicity was assessed by cell viability in macrophages and tumor cells. Statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey post-test, with significance level of 5%. Regarding the migration of neutrophils, the results showed no significant difference between the groups except for animals that received dexamethasone and the association apigenin + tt-farnesol. In both groups, the neutrophil count was significantly lower than the others ($p < 0.001$). On the paw edema test, none of the evaluated times were no significant differences between experimental groups, except for the time of 240 minutes, when the paw edema of group apigenin + tt-farnesol and dexamethasone (positive control) was significantly less than observed in the 100 μL apigenin ($p < 0.05$). The mice that received dexamethasone were the only ones who showed no difference in edema between the time of analysis ($p = 0.072$). In group apigenin + tt-farnesol, edema in time 240 minutes was similar to the dexamethasone group (positive control - $p < 0.05$). In the assessment of cytotoxicity / cell viability, it was found that the cells remained viable in the three experimental period (24, 48 and 72 hours), with a lower mitochondrial activity at 24 hours for intact cells. With respect to tumor cells, there was a reduction in cell viability at the same times. It was concluded that there is anti-inflammatory activity of the substances when applied alone, however, have a higher expression when linked, furthermore, both as apigenin-farnesol tt are not toxic to intact cells, since the positive maintenance of cell viability which was not observed for tumor cells.

Keywords: Flavonoids, anti-inflammatory agents, cell survival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Novas fontes químicas, entre janeiro de 1981 a junho de 2006.....	24
Figura 2 – Composições básicas dos flavonoides	28
Figura 3 – Estrutura química da apigenina (C ₁₅ H ₁₀ O ₅)	28
Figura 4 – Estrutura química do tt-farnesol (C ₁₅ H ₂₆ O)	31
Figura 5 – Balança de precisão (MAJE®)	39
Figura 6 – Filtragem em membranas planas de 0,22 µm (Millipore®)	39
Quadro 1 – Grupos experimentais e substâncias testadas para o modelo de migração de neutrófilos.....	40
Figura 7 – Aplicação das substâncias por via subcutânea	41
Figura 8 – Inoculação da substância indutora de inflamação (tioglicolato a 4%) na cavidade peritoneal.....	41
Figura 9 – Manipulação da região abdominal dos animais seguida de punção com seringa para coleta do material a ser analisado	42
Figura 10 – Administração da substância carragenina a 1% em região subplantar da pata direita.....	44
Quadro 2 – Grupos experimentais e substâncias testadas no teste de edema de pata.....	44
Figura 11 - Pletismômetro de pata para ratos e camundongos (Insight®).....	45
Figura 12 – Células em cultura. Monitoramento do crescimento celular. (A) e (B) células em fase de crescimento; (C) células em estado de subconfluência	46
Figura 13 – Delineamento do estudo.....	49
Gráfico 1 - Volumes, em mL, referentes ao edema de pata dos animais submetidos à inoculação das diferentes substâncias.* Diferença significativa em relação aos demais grupos.....	51
Gráfico 2 - Contagem de neutrófilos nos grupos avaliados. Cada barra representa a média e a barra de erro, o desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, p<0,05).....	53

Gráfico 3 - Absorbância no <i>TP reader</i> (modo ELISA) corrigidos em relação ao valor do meio de cultura controle em células íntegras (macrófagos). Cada coluna representa a média e a barra o desvio padrão da média.....	56
Gráfico 4 - Absorbância no <i>TP reader</i> (modo ELISA), corrigidos em relação ao valor do meio de cultura controle em células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Cada coluna representa a média e a barra o desvio padrão da média.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Volumes em mL referentes ao deslocamento de água verificado para o edema de pata em camundongos <i>Swiss</i> após inoculação das soluções (n=30).....	50
Tabela 2- Contagem de neutrófilos em camundongos <i>Swiss</i> após inoculação das substâncias controles e experimentais.....	52
Tabela 3 - Níveis de absorbância referentes à viabilidade de células íntegras e tumorais avaliadas em diferentes momentos da análise.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	microlitro
µm	micrômetro
a.C.	antes de Cristo
<i>ad libitum</i>	à vontade (latim)
ADA	<i>American Dental Association</i>
AINES	anti-inflamatórios não esteroidais
ANSI	<i>American National Standards Institute</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BRP	Própolis brasileira vermelha
cm ²	centímetros quadrados
CO ₂	dióxido de carbono (gás carbônico)
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	ciclo-oxigenase-2
d.C.	depois de Cristo
DMEM	<i>Dulbecco Minimum Essencial Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido diaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
<i>et al.</i>	e outros (<i>et alii</i>)
g	grama
GTF	glicosiltransferase
h	horas
HO-1	hemi-oxigenase-1
IL	Interleucina
iNOS	síntese óxido nítrico induzida
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
kg	quilograma
L	litro
mg	miligrama
mL	mililitro

mM	milimolar
mm	milímetro
mm ³	milímetro cúbico
MTT	<i>1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan</i>
NaCl	Cloreto de sódio
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
nº	número
PBV	Própolis brasileira vermelha
PGE2	prostaglandina E2
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
rpm	rotações por minuto
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
tt-farnesol	trans-trans-farnesol
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UNICAMP	Universidade de Campinas

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
°C	grau Celsius
D _p	resultado da diluição
p	nível descritivo ou p-valor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Própolis.....	22
2.1.1	Composição da própolis.....	24
2.2	Apigenina e tt-farnesol.....	28
2.3	Métodos de avaliação.....	32
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Aspectos Éticos.....	37
4.2	Amostra.....	37
4.3	Diluição da substâncias.....	37
4.4	Fase experimental.....	38
4.4.1	Modelo de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos.....	39
4.4.2	Teste de edema de pata.....	43
4.4.3	Teste de citotoxicidade.....	45
4.5	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS.....	50
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	GLOSSÁRIO.....	73

APÊNDICE.....	75
ANEXO.....	76

1 INTRODUÇÃO

As substâncias e os produtos naturais ainda são as principais fontes inovadoras de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças de ordem sistêmica e da cavidade bucal em humanos (KOEHN; CARTER, 2005). Cerca de 70% de todos os agentes antimicrobianos introduzidos entre 1981 e 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003).

O crescimento mundial da fitoterapia entre os programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação dos extratos de plantas para o uso nas ciências biomédicas. Na Odontologia, as investigações são direcionadas especialmente no controle do biofilme dentário e outras afecções bucais. Com isso, tanto a Odontologia como a Medicina são beneficiadas pela riqueza de recursos naturais oferecidos pela flora brasileira, pois os produtos naturais estão cada vez mais presentes nos consultórios médicos e odontológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Entre os produtos naturais, a própolis tem sido um dos mais investigados. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a define como uma substância de características físicas resinosas e composição variável, coletada de várias espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha, em especial da espécie *Apis mellifera L.*, sendo classificada como opoterápico¹ (BRASIL, 2005).

A primeira propriedade da própolis demonstrada cientificamente foi sua capacidade antimicrobiana (GHISALBERTI, 1979). Outras propriedades como a anti-inflamatória, antitumoral, hepatoprotetora, antiviral, antifúngica e antioxidante também já foram investigadas (BANKOVA *et al.*, 1995).

¹ Medicamentos específicos adquiridos por meio de órgãos, glândulas, tecidos e secreções animais.

Uma de suas principais características é sua composição complexa, variável de acordo com a região onde foi produzida e a sazonalidade (BANSKOTA *et al.*, 2000), aspectos ainda mais marcantes na própolis brasileira, devido à diversidade da flora e tipos climáticos. O Brasil é o segundo produtor mundial de própolis, sendo superado apenas pela China.

O avanço dos estudos da composição da própolis mostrou como promissora a utilização isolada de alguns componentes (SALATINO *et al.*, 2011). Entre eles, foram identificados dois agentes

também encontrados em plantas e alimentos, a apigenina e o trans-trans-farnesol (tt-farnesol), caracterizados como flavonoides/terpenoides (polifenóis) e promitentes compostos naturais contra o biofilme dentário, cada qual apresentando distintas atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*.

A apigenina é um bioflavonoide não tóxico e não mutagênico encontrada em frutas e legumes, sendo um potente inibidor da atividade de enzimas glicosiltransferases, tanto em solução como em superfícies alcançando até 60% de redução (KOO *et al.*, 2002, 2003b), também foram capazes de inibir a produção de ácido láctico, e glucano por *S. mutans* no biofilme dentário (KOO *et al.*, 2003a, 2005), ações importantes para o controle da cárie dentária. O tt-farnesol é um álcool sesquiterpeno encontrado em óleos essenciais de frutas cítricas e tem sido utilizado na indústria cosmética devido ao seu aroma agradável. No entanto, o mecanismo exato da ação desses agentes isolados é atualmente desconhecido.

Deve-se ressaltar que a própolis constitui um aglomerado de substâncias, podendo haver interferência nas propriedades individuais dos componentes. Essa premissa evoluiu junto com os estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliaram os extratos de própolis. Com as perspectivas de utilização dos componentes isolados e de melhores resultados, estudos foram desenvolvidos sem a preocupação de verificar antecipadamente as reações do organismo mediante contato com frações separadas como a apigenina e tt-farnesol. Até então, estudos mostram que essas substâncias são efetivas no controle de agentes etiológicos e patologias instaladas. Entretanto, não se sabe se são capazes de provocar fenômenos frequentes do organismo em resposta, a inflamação.

Pesquisadores mostraram, em estudos *in vivo*, que a utilização dessas substâncias é ocasionalmente associada à necrose e irritação tecidual (JOO; JETTEN, 2010), ainda que já demonstradas propriedades farmacológicas hepatoprotetoras (BANSKOTA *et al.*, 2000). Por outro lado, várias drogas sintéticas proporcionam efeitos secundários desconhecidos, o que reforça a necessidade de se pesquisar produtos naturais, a exemplo dos polifenóis, como novos e seguros anti-inflamatórios.

Outro aspecto, relatado no estudo de Santangelo *et al.*, (2007), refere-se ao fato de que os polifenóis inibem as enzimas celulares, tais como COX, a fim de reduzir a produção de prostaglandinas, exercendo assim uma importante ação anti-inflamatória.

Para sanar essa premissa de ação inespecífica, ensaios laboratoriais foram regulamentados por organizações internacionais (*International Organization for Standardization* - ISO), incluindo testes iniciais, secundários e testes de uso (ISO, 1992), o que trouxeram respaldo para a continuação dos estudos com produtos naturais.

Entre os ensaios laboratoriais estão os testes para avaliação da atividade anti-inflamatória e cultura de tecidos. A migração de neutrófilos, bem como o teste de edema de pata são indicados para avaliar reações anti-inflamatórias assistidas. A contagem de neutrófilos se deve ao fato de que estas células são a primeira linha de defesa na inflamação e rápida velocidade de migração. O edema de pata justifica-se por refletir um dos sinais cardeais da inflamação.

A cultura de tecidos foi desenvolvida como um método de estudo do comportamento das células animais sem a interferência das variações de temperatura e estresse que podem ocorrer no animal durante o experimento. É um método utilizado para investigação de reações citotóxicas causadas por drogas e materiais diversos, sendo reprodutível e seus protocolos standardizados pela *International Organization for Standardization* (ISO), logo, assume um papel de destaque em relação a sua importância (YOKOMIZO, 2001).

Mediante a ausência de avaliações sobre as consequências do contato direto da apigenina e tt-farnesol sobre tecidos e a necessidade dessas respostas a fim de se realizar estudos clínicos, este estudo propôs a investigação da capacidade anti-inflamatória e citotoxicidade dessas duas substâncias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Própolis

A própolis é uma resina estruturalmente complexa; uma substância balsâmica tipo goma que contém aproximadamente 50-55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen e 5% de outras substâncias que variam de acordo com a flora da região e as espécies de abelhas. Dentro da colmeia, a própolis é utilizada como paredes internas e para selar possíveis aberturas, permitir o controle térmico da colônia e evitar a entrada de outros insetos. Além disso, é utilizada para embalsamar insetos mortos e evitar a proliferação de micro-organismos na colônia. O uso da própolis pelo homem remonta aos tempos passados, quando o produto era empregado no embalsamento de corpos no Egito antigo (GHISALBERTI, 1979).

A própolis é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* L. (MENEZES, 2005). Sua utilização é bastante conhecida na medicina popular por não ser tóxica e pelas atividades biológicas e terapêuticas que incluem as ações antimicrobiana, anti-inflamatória, anestésica e pelas propriedades citostáticas (GEBARA *et al.*, 1996).

Em relação à inflamação e algumas doenças infecciosas, a própolis tem apresentado bons resultados como coadjuvante no tratamento. Trata-se de uma substância relativamente atóxica e com atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias, fungos, parasitas e vírus (BANKOVA *et al.*, 1995; STEINBERG *et al.*, 1996; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; SFORCIN *et al.*, 2000; ITO *et al.*, 2001).

Além de uma atividade antimicrobiana e outras propriedades biológicas e farmacológicas demonstradas, Banskota *et al.* (2000) incluíram ação antitumoral,

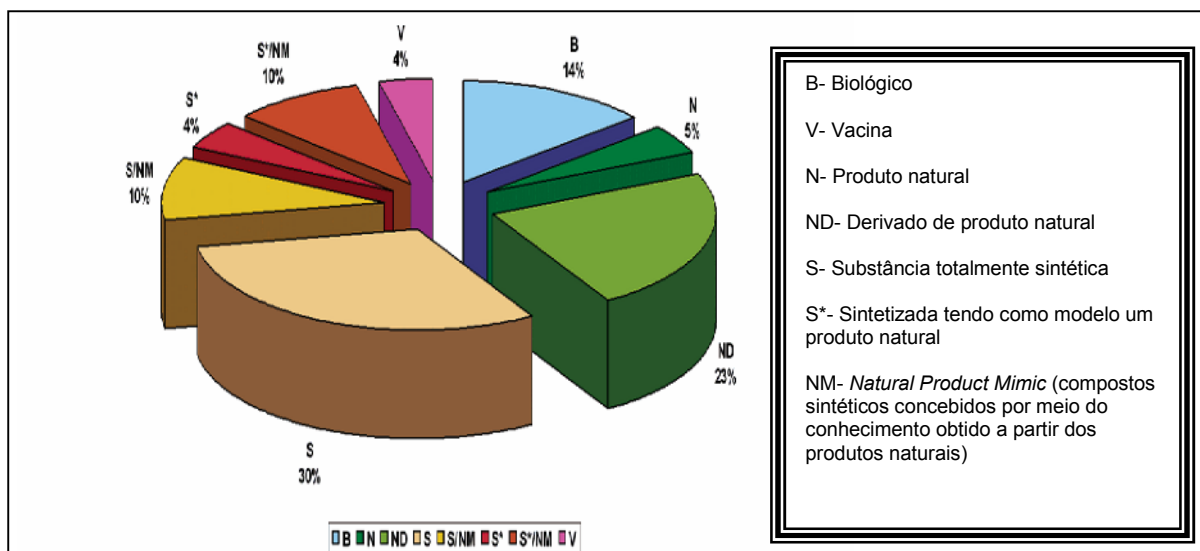
citotóxica, hepatoprotetora, antioxidante, hematostimulativa e propriedades imunomoduladoras.

As qualidades de seus componentes ainda precisam de estudos para verificação e confirmação de sua eficiência medicinal. A farmacodinâmica da própolis tem sido revisada no que diz respeito às suas propriedades medicinais em relação à tolerância e efeitos indesejáveis. Nagai *et al.* (2001) destacaram as propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante da própolis. Essas características terapêuticas são provenientes da vasta composição química da substância.

A importância dada aos produtos naturais terapêuticos se confirma no trabalho de Newman e Cragg (2007), no qual analisaram as fontes de novas drogas aprovadas para o tratamento de doenças humanas. Foram quantificadas 1184 novas substâncias químicas no período de 1981 a 2006, sendo 70% de origem natural (Figura 1).

Ressalta-se o fato de que a primeira propriedade medicinal cientificamente avaliada da própolis foi a atividade antibacteriana. Nas últimas décadas, a mesma, bem como seus componentes, ganharam ampla aceitação na medicina popular em várias partes do mundo. Tal popularidade tem estimulado o uso comercial em produtos de uso diário e demonstra um grande interesse na pesquisa química da própolis e suas atividades biológicas (SALATINO *et al.*, 2011).

Figura 1 – Novas fontes químicas, entre janeiro de 1981 a junho de 2006.



(Fonte: NEWMAN; CRAGG, 2007, p. 472).

2.1.1 Composição da própolis

A própolis constitui uma substância complexa, na qual já foram identificados mais de 300 componentes químicos, variando de acordo com sua origem botânica (BURDOCK, 1998).

De acordo com Koo *et al.* (1999), os dados sobre as variações na composição do conteúdo da própolis, especialmente os flavonoides, são importantes na fabricação de produtos de higiene oral, sendo que muitos países não têm qualquer tipo de controle químico para a padronização da qualidade. Neste contexto, a variabilidade química da própolis em diferentes países pode ser considerado um importante obstáculo para a implementação de uma rede internacional de padronização.

Em amostras de própolis tipificadas da região do Chile, Muñoz *et al.* (2001) demonstraram a presença de substâncias terpenoides e flavonoides. Entre esses últimos, acacetina, ácido cinâmico, cumarina, galangina, izalpina, preniletina, vanilina, apigenina e tt-farnesol.

Os componentes flavonoides são polifenóis e demonstram uma série ampla de atividade bioquímica e efeitos farmacológicos, incluindo capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antiplaquetária, ação antitrombótica, e efeitos antialérgicos. Podem bloquear atividades metabólicas como a síntese de prostaglandina por inibir enzimas como a ciclo-oxigenase, intimamente relacionada com a gênese da inflamação. Os flavonoides estão presentes em vegetais (luteolina e apigenina) e em frutas (quercetina, miricetina e tt-farnesol). Constituem uma grande família de mais de 4000 metabólitos secundários de plantas, sendo muitos, como açúcares conjugados. Estudos epidemiológicos têm indicado uma relação entre uma dieta rica em flavonoides e uma redução da incidência de doença cardíaca pela ação anticoagulante (MIEAN; MOHAMED, 2001).

No Brasil, por exemplo, autores relataram que a própolis de distintas regiões foram quimicamente classificadas em 12 tipos (PARK *et al.*, 2002). Entre os numerosos grupos de substâncias identificadas na própolis de diferentes localidades, os mais comumente encontrados foram grupos aromáticos, ácidos e ésteres, flavonoides, terpenoides e cera. A maioria das atividades biológicas da própolis tem sido atribuída a esses compostos, especialmente aos flavonoides (MARCUCCI, 1995; MARCUCCI *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002). A esse respeito, a atividade antimicrobiana tem sido atribuída aos flavonoides também. No entanto, outros componentes presentes na própolis, tais como derivados de ácidos aromáticos, ésteres e terpenoides, podem apresentar ações inibitórias sobre os bactérias e vírus.

Entre os componentes da própolis, os polifenóis foram identificados por Isla *et al.* (2005) ao examinarem vinte e cinco amostras de própolis da região nordeste da Argentina. Verificaram que 16 delas apresentaram perfis parecidos, obtidos através

do método de espectros de absorção. Identificaram flavonoides semelhantes, em qualidade, aos da própolis que foram coletados no sul do Brasil. Embora a origem botânica da própolis seja importante, isso não altera substancialmente sua ação. Qualitativamente, o conteúdo de flavonoides na maioria das amostras de própolis coletadas se assemelhou entre as regiões de diferentes climas (temperado como Europa, América do Norte e Nova Zelândia). Essas apresentaram maior capacidade antimicrobiana e antioxidante e também continham maiores concentrações de compostos fenólicos.

Alternativamente, um grande número de polifenóis têm sido consumidos na dieta e suas atividades anti-inflamatórias têm sido relatadas. Polifenóis podem ser classificados em dois grupos diferentes: flavonoides e ácidos fenólicos. Esses compostos têm recebido considerável atenção em pesquisas. De fato, 12 dos 40 anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994 foram obtidos a partir ou com base nesses produtos naturais. Alguns polifenóis, quando utilizados em excesso, resultaram em redução no crescimento em animais de laboratório. No entanto, a ingestão de pequenas quantidades de polifenóis em alimentos apresenta um potente efeito na redução de doenças crônicas (artrite reumatóide e osteo-artrite) em modelos animais (YOON; BAEK, 2005).

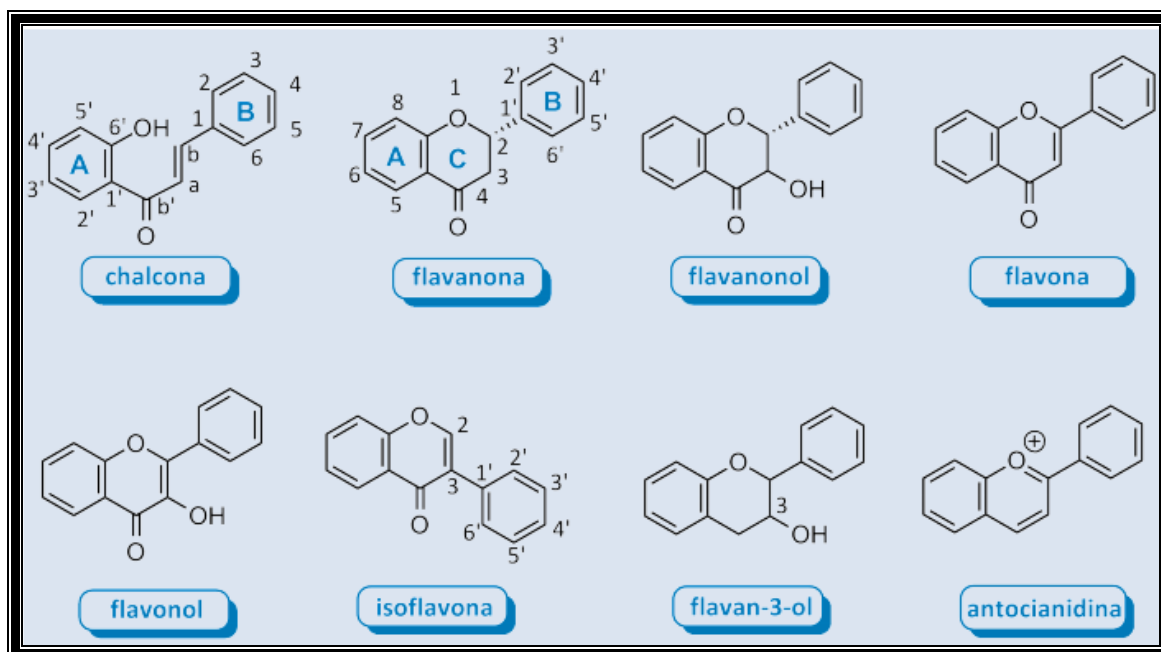
Em 2007, um grupo de pesquisadores (SILVA *et al.*, 2007) da Universidade de Campinas (UNICAMP) estudaram a composição química e origem de um novo tipo de própolis brasileira, a variedade chamada vermelha (BRP ou PBV). Foi demonstrada ser uma substância não tóxica, resinosa, como aquelas comumente estudadas. Foi classificada em 12 tipos, de acordo com as propriedades físico-químicas e localização geográfica. A principal origem botânica da própolis brasileira, nas regiões Sul, Nordeste e Sudeste, foi relatada como uma resina de *Populus sp.*,

Hyptis divaricata e *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), respectivamente. Os pesquisadores concluíram que a própolis brasileira é bastante diversificada em sua composição química, devido ao Brasil ser rico em biodiversidade. Isso justifica a necessidade de ser investigada como uma fonte de novas substâncias bioativas, tais como derivados de ácido cinâmico, principalmente Artepillin C, flavonoides e outros com propriedades farmacológicas ou funcionais. Ainda, afirmaram que a composição é semelhante ao tipo específico de própolis vermelha de Cuba, produzido na província de Pinar Del Rio, que tem vários isoflavonoides com ação antimicrobiana, antifúngica, anticancerígena, antioxidante, além de aliviar os sintomas da menopausa e prevenir a osteoporose.

Em 2009, Libério *et al.* relataram que a composição da própolis pode variar entre diferentes áreas geográficas e, como consequência, a intensidade ou a presença de algumas atividades biológicas também varia. No entanto, mesmo dentro do mesmo país, a composição de própolis pode ser quantitativa e qualitativamente diferentes, dependendo da região e período de sua coleta.

A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas, como podem ser vistas na Figura 2 (COUTINHO *et al.*, 2009).

Figura 2 – Composições básicas dos flavonoides.

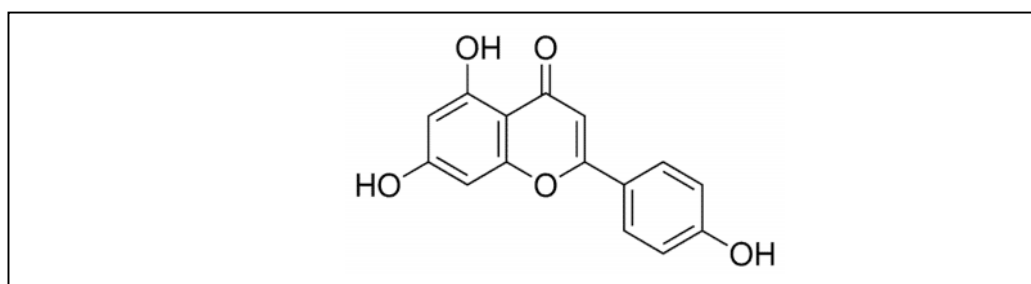


(Fonte: COUTINHO *et al.*, 2009; p.247).

2.2 Apigenina e tt-farnesol

A apigenina (Figura 3) é designada pelo seu nome usual, porém, tem seu nome oficial como 5,7,4'-triidroxiflavona. Marcucci, em 1996, descreveu essa substância como sendo promissora entre os flavonoides, atribuindo a esta, somente ação antiúlcera.

Figura 3 - Estrutura química da apigenina ($C_{15}H_{10}O_5$).



(Fonte: COUTINHO *et al.*, 2009; p.247).

Dessa forma, Koo *et al.* (2003a) investigaram a influência da apigenina e do tt-farnesol, isolados e combinados, no acúmulo e na composição do polissacarídeo

(glucanos e frutanos) e viabilidade do biofilme de *S. mutans* (UA159). Os biofilmes foram cultivados por 54 h e após formados, foram tratados por um minuto, duas vezes ao dia. No teste, o peso seco dos biofilmes foi significativamente menor (30-50%) do que o controle ($p < 0,05$). Biofilmes tratados com as substâncias do teste também resultaram em menos polissacarídeos intracelulares. A atividade enzimática foi afetada apenas pela apigenina e sua combinação com o tt-farnesol. As contagens viáveis de *S. mutans* foram ligeiramente inferiores após tratados com essas substâncias, comparados com o controle. A clorexidina exibiu potente atividade bactericida e praticamente cessou o acúmulo de biofilme em 54 h. Assim, concluíram que a apigenina e o tt-farnesol afetaram a porcentagem de acúmulo e composição de polissacarídeos, sem grande impacto sobre a viabilidade bacteriana.

Nessa linha de investigação, no ano seguinte, Koo *et al.* (2003b) determinaram os efeitos, isolados e em combinação, sobre a atividade da glicosiltransferase (GTF), bem como a viabilidade do biofilme e do desenvolvimento de cáries em ratos. Para tanto, infectaram ratos *Sprague-Dawley* com *Streptococcus sobrinus* e trataram, topicamente, duas vezes ao dia. O grupo da apigenina (concentração de 1,33 mM) inibiu a atividade da glicosiltransferase (GTF) em solução (90-95%). O grupo do tt-farnesol (concentração de 1,33 mM) mostrou menor atividade antibacteriana contra o biofilme e menor efeito sobre a enzima GTF. A associação apigenina e tt-farnesol reduziu a incidência de cárie em superfície lisa em 60%; fluoreto reduziu 70% essa incidência; já a clorexidina reduziu em 72%, comparando com o tratamento controle ($p < 0,05$).

Em 2005, Koo *et al.* examinaram a associação da apigenina e o tt-farnesol na melhoria da propriedade anticárie do fluoreto agindo conjuntamente na expressão da virulência de *Streptococcus mutans*. O efeito biológico dos compostos estudados foi

grandemente reforçada quando usado em combinação com o fluoreto. Em geral, os biofilmes tratados com apigenina e/ou com o tt-farnesol combinados com o fluoreto exibiram menos biomassa e menos glucanos insolúveis e polissacarídeos do que aqueles tratados com as substâncias isoladas ($p < 0,05$). A combinação das substâncias-teste com o fluoreto foi altamente eficaz, impedindo o desenvolvimento de cárie nos animais estudados, com resultados comparáveis com aqueles observados com clorexidina/fluoreto, que serviu de controle positivo.

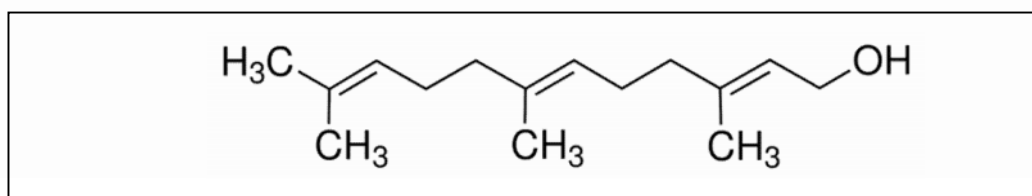
Embora a apigenina apresente vários efeitos biológicos, o seu papel anti-inflamatório no campo da Periodontia, por exemplo, ainda permanece desconhecido. Jeong *et al.* (2009) examinaram os efeitos anti-inflamatórios da apigenina e seus mecanismos subjacentes em células do ligamento periodontal humano. Como resultados, em células incubadas com apigenina, houve diminuição da expressão da proteína HO-1 e sua atividade. A apigenina inibiu significativamente a produção de NO, PGE2, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12, e regulou a expressão da COX-2 nas células. Através desses dados, os autores afirmaram a presença de atividade anti-inflamatória da apigenina em células do ligamento periodontal humano através de um singular mecanismo. Assim, a apigenina traria benefícios potenciais como um modulador na prevenção e tratamento da doença periodontal. Além disso, observaram ausência de efeito citotóxico do produto sobre as células estudadas.

Unnanuntana *et al.* (2009) utilizaram o farnesol como agente antifúngico e demonstraram que há atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Investigou-se os efeitos do farnesol sobre a formação de biofilmes bacterianos em biomateriais ortopédicos e seus efeitos sobre osteoblastos. Utilizaram biofilmes de *Staphylococcus aureus* (Seattle 1945GFPuvr) cultivados em discos de liga de titânio e seus efeitos foram examinados por microscopia de

fluorescência em culturas de células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1). O farnesol solúvel, na concentração de 30 mM, reduziu o número de bactérias viáveis (104 vezes) e inibiu completamente a formação de biofilme. Baixas concentrações de farnesol solúvel (0,03 a 3 mM) não inibiu a formação de biofilme e não potencializou o efeito de uma concentração de gentamicina; reduziu o número de bactérias viáveis em 50% e teve sua ação sobre o biofilme bacteriano durante três dias. Em concentrações de 3 mM e 30 mM, inibiu propagação das células MC3T3-E1. Os autores concluíram que, *in vitro*, uma concentração elevada de farnesol (30 mM) mostrou propriedades antimicrobianas, no entanto, também teve um efeito negativo sobre a células pré-osteoblásticas.

O tt-farnesol (3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol, *trans,trans*-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol) é um álcool sesquiterpeno acíclico (Figura 4) encontrado como um líquido incolor. É insolúvel em água, mas miscível em óleos. É um agente quimiopreventivo e antitumoral, além de possuir atividade antibacteriana. Induz a parada do ciclo celular e apoptose em uma variedade de tipos de células de carcinoma, o que torna sua utilização restrita para determinados tratamentos (JOO; JETTEN, 2010).

Figura 4 - Estrutura química do tt-farnesol (C₁₅H₂₆O).



(Fonte: COUTINHO *et al.*, 2009; p.247).

2.3 Métodos de avaliação

Em relação ao uso de corante em testes laboratoriais, o método com MTT (1-

(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazan) para a avaliação da toxicidade celular é, segundo Mossman (1983), extremamente confiável, rápido, facilmente reproduzível e reflete a viabilidade celular pelo número de células da amostra. A exigência de avaliar a toxicidade potencial de compostos usados a partir de produtos farmacêuticos, cosméticos, aditivos alimentares e pesticidas para produtos químicos, industriais ou fertilizantes, está crescendo rapidamente devido às pressões comerciais e maior regulamentação. O método de ensaio precisa ser confiável, sensível e adequado para o aumento da produtividade com testes múltiplos na mesma amostra. Ensaio de citotoxicidade foram um dos primeiros ensaios *in vitro* usados para prever o efeito danoso de substâncias para vários tecidos e são, hoje, amplamente utilizados para a determinação de proliferação celular, viabilidade ou atividade estrutural. O benefício adicional de tais ensaios é que limitam a exigência de experimentação animal, e sua triagem requer quantidades muito menores do material de ensaio.

Além das atividades anti-inflamatórias dos produtos naturais, como a apigenina e o tt-farnesol, e pela sua utilização no tratamento para as alterações na Oncologia, é preocupante o fato de que essas substâncias tenham ação inespecífica sobre células sadias. A *International Organization for Standardization* (ISO), em 1992, regulamentou através do documento nº 41 da ANSI/ADA, a realização de testes biológicos de materiais, cujo documento foi denominado como ISO 10993, com a seguinte caracterização: (1) Testes iniciais, que incluem testes de citotoxicidade em cultura de células; (2) Testes secundários, que compreendem implantes subcutâneos em ratos; (3) Testes de uso, de aplicação ou pré-clínico, que incluem experimentos em animais de grande porte, como cães e seres humanos.

Anteriormente a isso, a utilização de culturas de células tornou-se cada vez mais uma prática comum nos laboratórios de controle de qualidade. Com o estabelecimento de um grande número de linhagens de células animais e humanas, pode-se testar uma série de produtos, desde drogas a materiais plásticos, com intuito de avaliar o potencial de citotoxicidade. Testes *in vitro* vêm substituindo os ensaios *in vivo*, principalmente pelos custos reduzidos, alta reprodutibilidade e facilidade de realização. A confiabilidade científica dos estudos de citotoxicidade *in vitro* está relacionada à escolha da metodologia e tem como vantagens a simplicidade, facilidade na reprodução dos resultados, controle das condições experimentais, método bastante sensível, baixo custo, rapidez e respeito à bioética (HYAKUNA *et al.*, 1989).

Entende-se por citotoxicidade, a capacidade intrínseca do material de promover alteração metabólica de células em cultura, podendo essa culminar ou não em morte celular. A determinação da viabilidade, assim como a toxicidade celular, pode ser interpretada pela mensuração do grau de destruição da monocamada celular e contagem de células por exclusão com azul de Trypan (FRESHNEY, 2011).

A busca pela melhoria das propriedades físico-químicas de alguns materiais e substâncias tem sido preocupação frequente na Odontologia. Estudos *in vivo* têm mostrado que o uso de novas substâncias é ocasionalmente associado à necrose e irritação da polpa dentária, bem como do periodonto. Em um estudo de revisão literária, Hanks *et al.* (1996) verificaram que os modelos de compatibilidade *in vitro*, utilizados para estudar os materiais e seus efeitos tóxicos, são utilizados em testes de biocompatibilidade para simular e prever reações biológicas aos materiais, quando colocados dentro ou sobre os tecidos do corpo. Entretanto, ensaios de citotoxicidade tradicionais são realizados para medir, por meio de qualquer evento,

um estágio final, seja pela permeabilidade das membranas citoplasmáticas de células (mortas e/ou morrendo), ou algum parâmetro metabólico, como a divisão celular ou uma reação enzimática. Nessa última situação, podemos elencar os ensaios para iniciação de reações inflamatórias e imunológicas.

A fim de verificar a importância dessas reações prejudiciais, medidas foram tomadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), que aumentou o controle sobre a venda dos anti-inflamatórios não esteroidais inibidores da COX-2. A Agência publicou e incluiu alguns princípios ativos na lista de substâncias sob controle especial (Portaria 344/98). A partir dessa data, esses anti-inflamatórios só poderiam ser vendidos com retenção da receita médica pelo estabelecimento farmacêutico (ANVISA, 1998).

Deve-se lembrar que a inflamação é o mecanismo de defesa imunológica pelo qual o corpo combate as infecções ou lesões originadas de bactérias, vírus e outros patógenos. As características clínicas da inflamação são conhecidas como rubor (vermelhidão), calor, tumor (inchaço) e dor. Na sequência do processo da inflamação, a ativação excessiva ou inadequada do sistema imunológico pode ter efeitos graves. No início da década de 70, substâncias como a aspirina e outros anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) foram estudados quanto a capacidade de inibir a ciclo-oxigenase (COX), que produz as prostaglandinas (PGs), uma classe de mediadores fisiológicos e fisiopatológicos. Embora esteroides anti-inflamatórios e AINEs sejam usados atualmente para tratar a inflamação aguda, essas drogas não têm sido bem sucedidas na cura de doenças inflamatórias crônicas (SANTANGELO *et al.*, 2007).

Coutinho *et al.* (2009) relataram que na triagem da ação anti-inflamatória são utilizados diversos métodos *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* são realizados em

cultura de células e objetivam verificar se o flavonoide é capaz de reduzir ou até mesmo inibir a formação de mediadores, a produção de enzimas e citocinas envolvidas e a proliferação de linfócitos. Já os ensaios *in vivo* utilizam agentes indutores de inflamação nos animais de laboratório (por exemplo: carragenina), visando avaliar se o flavonoide é capaz de inibir/reduzir a formação do edema, a migração das células de defesa e a formação de mediadores e enzimas. No contexto da busca de flavonoides bioativos a partir de fontes vegetais, essa mesma linha de pesquisa vem estudando plantas medicinais utilizadas popularmente no tratamento de patologias que envolvam processos inflamatórios e desordens do sistema imune.

Da mesma forma, Sforcin e Bankova (2011) mencionaram que ensaios *in vitro* fornecem novas perspectivas a respeito do mecanismo de ação, e os experimentos *in vivo* devem informar as propriedades biológicas do produto. No entanto, há pouca informação disponível sobre a eficiência da própolis clinicamente, e um novo passo na complementação das pesquisas seria o desenvolvimento de sua modalidade de investigação, a fim de avaliar o potencial de própolis em pacientes. Complementaram que possíveis interações entre seus compostos isolados ou associados a outros medicamentos também devem ser investigados. Os autores indicaram o uso da própolis e seus compostos isolados em diferentes condições patológicas, tais como tumores, infecções, alergias, diabetes e úlceras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a possibilidade de utilização de dois componentes da própolis de *Apis mellifera L.* – a apigenina e o tt-farnesol, em estudos clínicos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a atividade anti-inflamatória das substâncias apigenina e tt-farnesol isoladas e associadas, através do modelo de migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de camundongos;
- Avaliar atividade anti-inflamatória das substâncias isoladas e associadas, através de teste de edema de pata em modelo murino;
- Analisar a viabilidade celular da apigenina e tt-farnesol em células íntegras e tumorais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Protocolo nº 386, Anexo).

4.2 Amostra

Foram utilizados 90 camundongos Swiss, aclimatados no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco, sob temperatura variando de 20-25 °C, ciclos de claro/escuro de 12/12 horas e ventilação controlada artificialmente. A dieta consistiu em ração para camundongos e água *ad libitum*. Os animais foram ambientados antecipadamente e submetidos à condição experimental nos períodos matutino e/ou vespertino, respeitados os prazos do delineamento do estudo.

Foram selecionados camundongos heterogêneos, saudáveis, adultos, com peso aproximado de 18 a 22 g e 40 dias de espera, nascidos no Biotério da Universidade Católica Dom Bosco. Foram excluídos animais anteriormente submetidos a qualquer outro tipo de experimento.

4.3 Diluição das substâncias

A apigenina (Sigma-Aldrich[®], PM 270,24) e o tt-farnesol (Sigma-Aldrich[®], PM 222,37) são fornecidos no mercado na forma de pó. Para o cálculo das diluições (D_p), a fim de se obter a solução com concentração final de 1,33 mM (KOO *et al.*, 2003a), foi aplicada a fórmula:

$$D_p = \text{Concentração} \times \text{peso molecular} \times \text{volume do solvente} \times \text{peso do produto}$$

Para a apigenina, obteve-se o resultado de 0,0359 g/100 mL do veículo ou solvente. Ao se converter para miligramas e diluição em 60 mL de veículo, obteve-se o resultado de 21,5 mg/60 mL. Para o tt-farnesol, obteve-se o valor de 88,7 mg/300 mL. As substâncias e porcentagens utilizadas para o solvente foram de 25% de álcool, 1,25% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 73,75% de água destilada (KOO *et al.*, 2003a), ou seja, para 450 mL de veículo utilizado na diluição, foram necessários 112 mL de álcool; 5,63 mL de DMSO e 331,87 mL de água destilada. Todas as diluições foram realizadas em capela de fluxo laminar (Veco Clean Plus[®], modelo Biosafe 12t B2, série FL 9522).

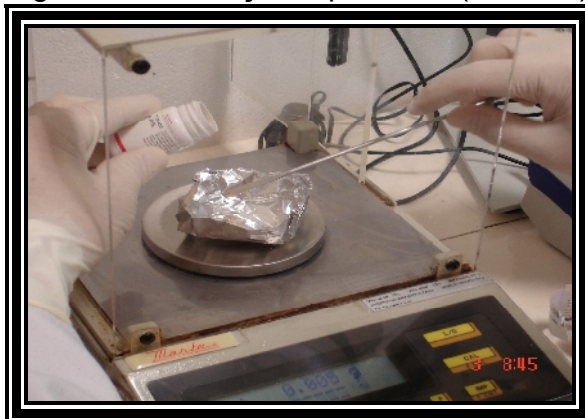
Para o preparo das substâncias, a pesagem foi realizada em balança de precisão (MAJE[®] Balanças e Equipamentos, Brasil) (Figura 5). Após a dissolução total, as soluções foram filtradas em membranas planas de 0,22 µm Millipore[®] (Millex GV JBR 6) (Figura 6).

4.4 Fase experimental

A fase experimental foi composta de dois ensaios para a análise da ação anti-inflamatória da apigenina e do tt-farnesol: o modelo de migração de neutrófilos e o

teste de edema de pata. Para a análise da citotoxicidade, foi desenvolvido o teste de viabilidade celular.

Figura 5 – Balança de precisão (MAJE®).



(Fonte: própria).

Figura 6 - Filtragem em membranas planas de 0,22 μm (Millipore®).



(Fonte: própria)

4.4.1 Modelo de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos

Para este teste de migração (SECCO *et al.*, 2003), foram utilizados sessenta camundongos, divididos em 12 grupos ($n=5$), cada qual recebendo as soluções testadas, como mostrado na Quadro 1.

Quadro 1 – Grupos experimentais e substâncias testadas para o modelo de migração de neutrófilos.

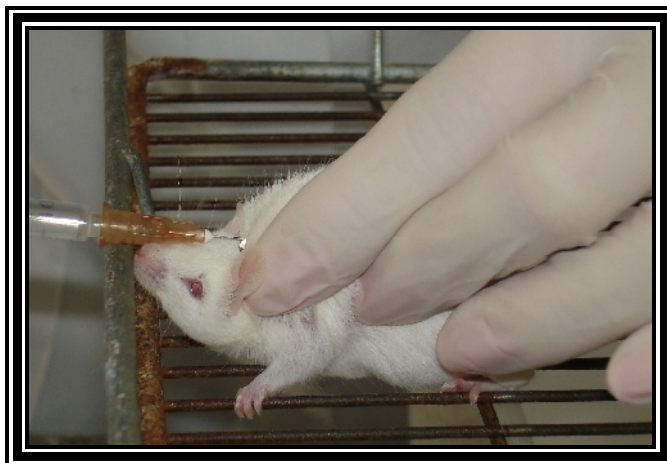
GRUPOS	SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÕES	QUANTIDADES
A	Apigenina (Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	50 µL
B	Apigenina (Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	100 µL
C	Apigenina (Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	150 µL
D	tt-farnesol (Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	50 µL
E	tt-farnesol(Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	100 µL
F	tt-farnesol (Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	150 µL
G	Tioglicolato	4%	500 µL
H	Veículo+salina	-	200 µL
I	Controle negativo (salina)	0,9%	200 µL
J	Controle positivo(dexametasona)	0,4 mg/Kg	200 µL
K	Carragenina	1%	500 µL
L	Apigenina + tt-farnesol (1:1)	1,33 mM	200 µL

As injeções das substâncias foram realizadas por via subcutânea (Figura 7), utilizando-se seringas para insulina BD ultra fina (BD Becton Dickinson, Nova Jersey, Estados Unidos da América). Após 15 minutos, foi inoculada a substância indutora de inflamação – o tioglicolato 4 %, na região peritoneal (Figura 8).

Decorridos 6 horas após as inoculações, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e por meio de deslocamento cervical. Procedeu-se a fase cirúrgica com incisão e afastamento da pele, injeção de etilenodiaminotetracético (EDTA) em diluição de 32,7 mg para 100 mL de solução salina 0,9 %, no volume de 3 mL. Em seguida, fez-se uma leve manipulação da região abdominal (Figura 9) a fim de promover o contato da solução de EDTA por toda a cavidade abdominal. A seguir,

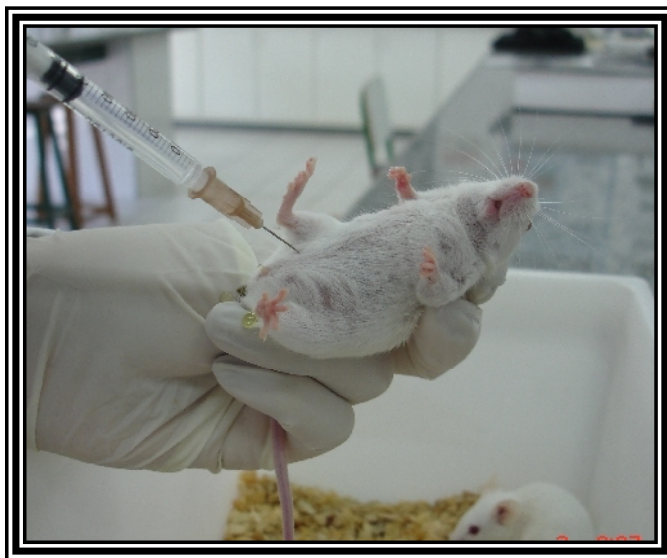
realizou-se a aspiração do líquido abdominal no máximo volume possível, sem danificar os órgãos, e armazenamento em tubos de ensaio autoclavados.

Figura 7 – Aplicação das substâncias por via subcutânea.



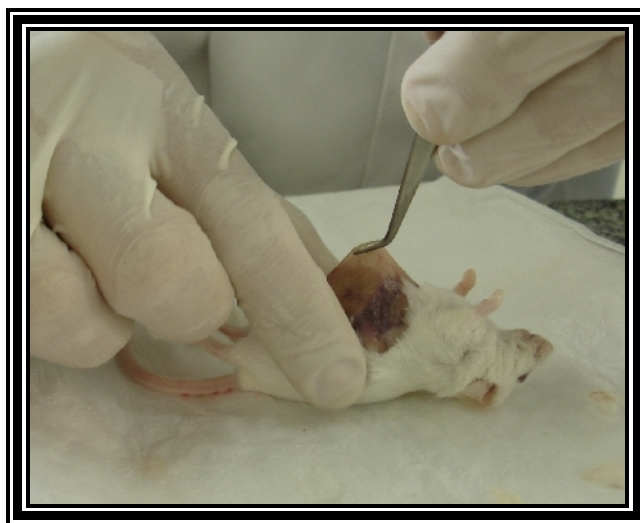
(Fonte: própria)

Figura 8 - Inoculação da substância indutora de inflamação (tioglicolato a 4%) na cavidade peritoneal.



(Fonte: própria)

Figura 9 - Manipulação da região abdominal dos animais seguida de punção com seringa para coleta do material a ser analisado.



(Fonte: própria)

As células totais presentes nesse lavado peritoneal foram contabilizadas com auxílio de contador automático de células sanguíneas CC530 (Celm[®], Brasil). Após a contagem, o material foi centrifugado a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos (Centrífuga MACRO IV, EV:025, EV Lab[®], Brasil); o sobrenadante foi separado e armazenado a -80 °C para testes futuros de mensuração de citocinas.

Para a contagem diferencial, os *pellets* foram ressuspensos e confeccionados os esfregaços em lâminas. O volume restante dos *pellets* foram armazenados em *ependorfs* contendo 50 µL de Trizol reagent[®] (Invitrogen life Technologies Corporation, Carsbad, EUA). A coloração utilizada foi o Panótico rápido LB[®]. Esta técnica é baseada no princípio de coloração de esfregaço

¹ A lâmina foi submetida à ação de um fixador e duas soluções corantes (soluções de triarilmetano 0,1%, xantenos 0,1% e tiazinas 0,1%) por meio de imersões de cinco segundos cada. Leitura após secagem ao final da última leitura (Romanowsky, 1965; In: Gurr E. The rational use of dyes in biology. 1965; p.115).

sanguíneo, que utiliza corante de May-Grunwald, estabelecida por Romanowsky¹ (1965).

A análise e contagem diferencial foram realizadas por um profissional bioquímico farmacêutico, especialista em hematologia, com auxílio de microscópio óptico (Nikon, modelo Eclipse E200, Japão). Foram contabilizados o número de neutrófilos, eosinófilos, basófilos e monócitos.

4.4.2 Teste de edema de pata

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,05 mL de carragenina 1 % em solução salina estéril e administrada na região subplantar da pata posterior direita do camundongo (WINTER *et al.*, 1962) (Figura 10). Para este teste foram utilizados 30 camundongos Swiss, divididos em seis grupos (n=5), conforme mostrado no Quadro 2.

Todas as substâncias foram inoculadas em tecido subcutâneo com seringa para insulina BD Ultra Fina[®] II (BD Becton Dickinson, Nova Jersey, Estados Unidos da América), de volume de 100 µL. Em seguida, foram realizadas as primeiras mensurações das patas em pletismômetro de pata para ratos e camundongos (Insight[®]) (Figura 11). Aguardou-se 15 minutos após a inoculação das substâncias para a injeção de carragenina 1% na região subplantar. As mensurações do edema das patas dos animais foram realizadas nos tempos de 0, 30, 60, 120 e 240 minutos. O edema foi mensurado pelo volume correspondente ao deslocamento de água registrado no pletismômetro antes e após a inoculação das substâncias experimentais e da carragenina 1 %.

Figura 10 – Administração da substância carragenina a 1% em região subplantar da pata direita.



(Fonte: própria)

Quadro 2 – Grupos experimentais e substâncias testadas no teste de edema de pata.

GRUPOS	SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÕES	QUANTIDADES
A	Solução salina (controle negativo)	0,9 %	200 µL
B	Dexametasona (controle positivo)	0,4 mg/Kg	200 µL
C	tt-farnesol (Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	100 µL
D	Apigenina (Sigma-Aldrich®)	1,33 mM	100 µL
E	Apigenina + tt-farnesol (1:1)	1,33 mM	100 µL
F	Veículo	-	200 µL

Figura 11 – Pletismômetro de pata para ratos e camundongos

(Insight®).



(Fonte: própria)

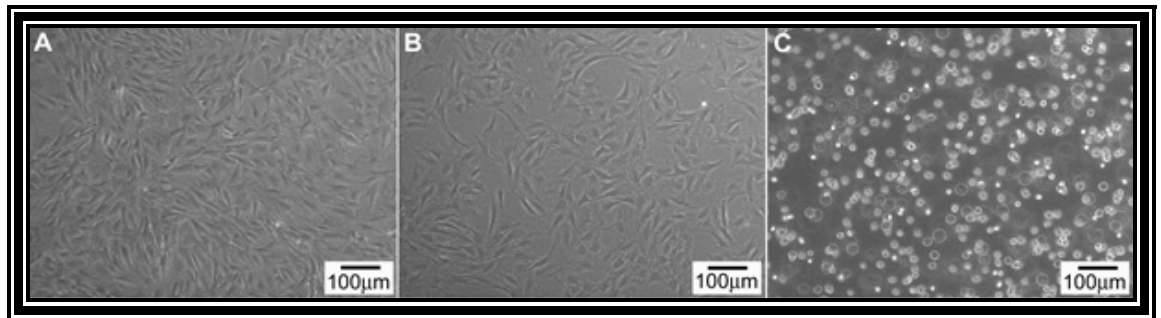
4.4.3 Teste de citotoxicidade

O teste foi baseado no documento nº 41 da *American National Standards Institute / American Dental Association* (ANSI/ADA). A *International Organization for Standardization* – ISO (1992) regulamentou a realização de testes biológicos de materiais por meio do documento ISO 10993, com caracterização de testes iniciais que incluem testes de citotoxicidade em cultura de células.

A linhagem de células foi constituída por macrófagos de camundongos. Foram cultivadas em garrafas pequenas de cultura celular (25 cm²), utilizando como meio de cultura *Dulbecco Minimum Essencial Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich®). As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera constituída de 95 % de ar e 5 % de CO₂.

Ao atingir 90% de confluência (Figura 12), as células foram retiradas utilizando-se tripsina 0,25 % com 5 mL de EDTA para a sequência do experimento.

Figura 12 - Células em cultura. Monitoramento do crescimento celular. (A) e (B) células em fase de crescimento; (C) células em estado de confluência.



(Fonte: ZHANG; CHAN, 2010).

As células foram lavadas duas vezes com solução salina fosfatada ($0,2 \text{ mL/cm}^2$), adicionado $500 \text{ }\mu\text{L}$ de tripsina a 37°C por 15 segundos, adicionado 4 mL de meio de cultura com 5% de soro fetal bovino, retiradas da garrafa, centrifugadas e separado o sobrenadante.

Para determinar o número de células existentes nos frascos originais, as células tripsinizadas foram transferidas para o tubo de ensaio e centrifugadas a 3000 giros durante cinco minutos. O sobrenadante foi aspirado e o precipitado de células foi ressuspensionado em 1 mL de DMEM. Parte dessa suspensão ($10 \text{ }\mu\text{L}$) foi transferida para o hemocitômetro (Câmara do tipo Neubauer) e com auxílio de microscópio, realizou a contagem de células.

Devido ao uso da câmara de Neubauer, o volume das células contido em 1 mL deve ser multiplicado por 10^4 , pois cada compartimento existente equivale a $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}^3$, o que corresponde a $0,1 \text{ mm}^3$ (FRESHNEY, 2011).

As células foram colhidas, diluídas de modo que fossem obtidas 10^5 células em cada $200 \text{ }\mu\text{L}$ /poço das placas de cultivo. A partir desse ponto, foram selecionadas três placas de cultivo celular com 96 poços, uma para cada tempo experimental (24, 48 e 72 horas), quando foram aplicados $100 \text{ }\mu\text{L}$ de meio de cultura

contendo 10^5 células/poço. Em seguida, foram mantidas a 37 °C em 5 % de CO₂ por 24 horas, para aderência celular.

Passadas as horas para aderência, os meios de cultura foram retirados cuidadosamente, por aspiração, a fim de se evitar o deslocamento da monocamada celular. Seguiu-se a aplicação das substâncias apigenina e tt-farnesol (1,33 mM) isoladas e em associação, bem como o veículo, respeitando o volume máximo de 200 µL em cada um dos micropoços. Para o controle, foi adicionado somente meio de cultura DMEM sem soro. O esquema da distribuição nos micropoços é mostrado no Anexo 2.

No final dos tempos experimentais, todos os meios foram aspirados novamente e aplicados 100 µL de DMEM fresco. Para avaliar a citotoxicidade da apigenina e do tt-farnesol na linhagem utilizada, foi empregado o método da análise colorimétrica com o corante *Thiazolyl blue* (MTT). O corante apresenta coloração amarela em sua forma oxidada, adquirindo coloração azul na forma reduzida, conversão que acontece por ação das desidrogenases mitocondriais, ou seja, ocorrerá apenas em células viáveis.

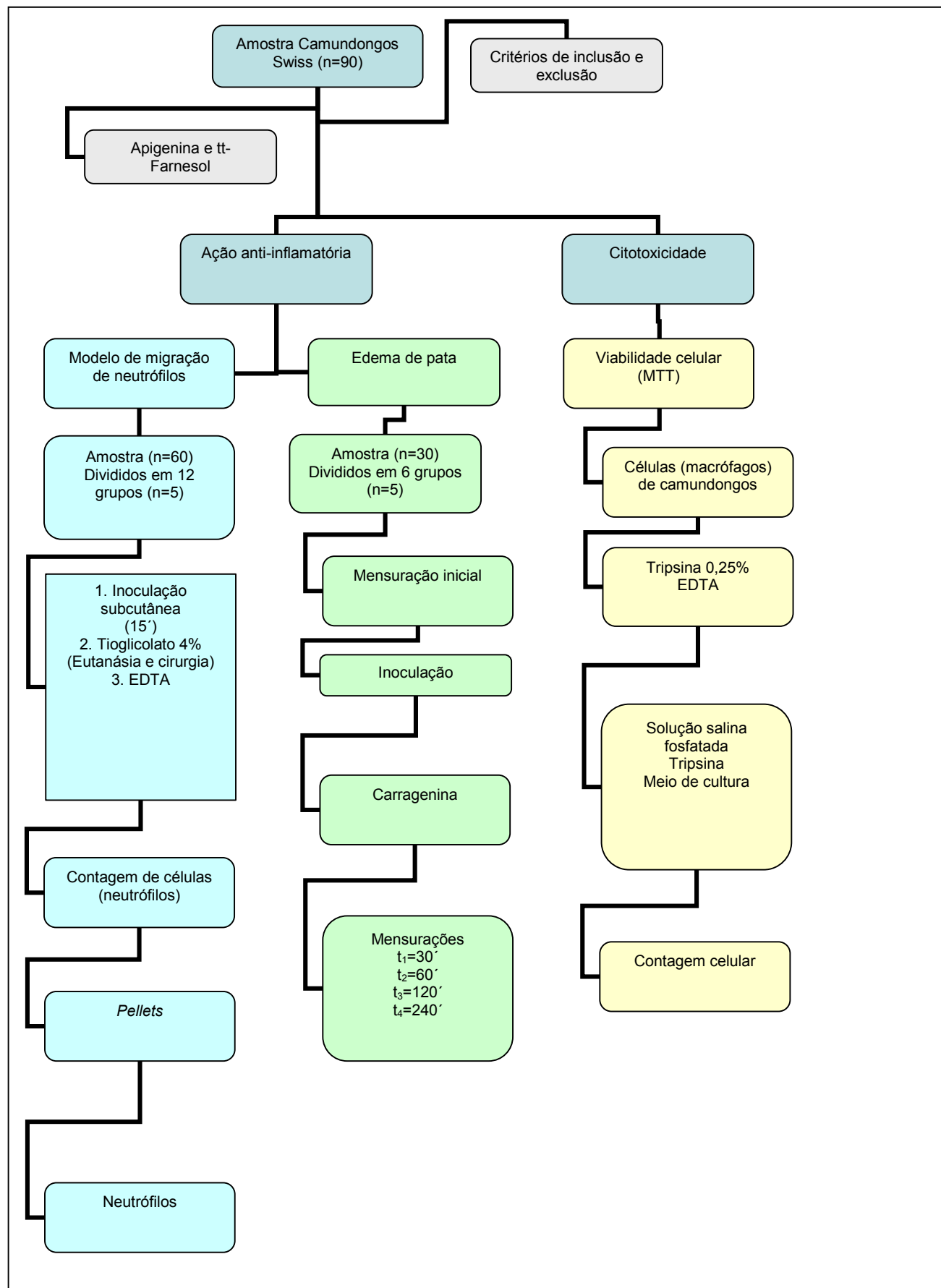
A viabilidade celular nas culturas tratadas com as duas substâncias foi medida por espectrofotometria da coloração obtida ao final da reação (Mossman, 1983).

Concluída essa etapa, o conteúdo dos poços foi misturado cuidadosamente e levados para leitura de absorbância no comprimento de onda de 630 nm. O delineamento do estudo é mostrado no Figura 13.

4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Tukey para o teste de migração de neutrófilos, teste ANOVA de uma via para avaliação do edema de patas e teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de Tukey para a análise da citotoxicidade. Para todas as análises, foi estabelecido o nível de significância de 5 %.

Figura 13 – Delineamento do estudo



5 RESULTADOS

Os resultados referentes à avaliação do edema de pata são apresentados na Tabela 1. Verificou-se atividade anti-inflamatória após administração da associação tt-farnesol + apigenina ($p=0,021$), do tempo ($p<0,001$) em que a análise foi realizada e interação entre grupo e tempo ($p=0,002$).

Tabela 1 – Volumes em mL referentes ao deslocamento de água verificado para o edema de pata em camundongos Swiss após inoculação das soluções (n=30)

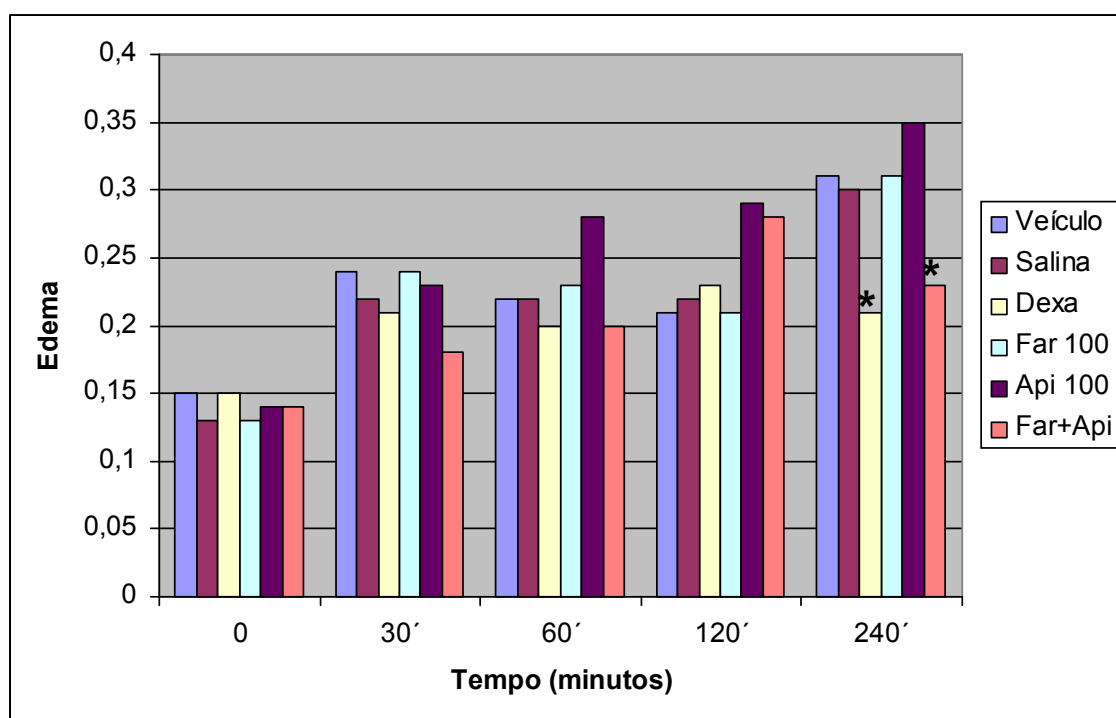
Grupos	Tempo (minutos)				
	0	30	60	120	240
Veículo	0,15±0,05 ^{Ac}	0,24±0,05 ^{Aab}	0,22±0,04 ^{Abc}	0,21±0,05 ^{Abc}	0,31±0,06 ^{ABa}
Salina	0,13±0,05 ^{Ab}	0,22±0,05 ^{Aa}	0,22±0,02 ^{Aa}	0,22±0,06 ^{Aab}	0,30±0,05 ^{ABab}
Dexametasona	0,15±0,03 ^{Aa}	0,21±0,03 ^{Aa}	0,20±0,04 ^{Aa}	0,23±0,06 ^{Aa}	0,21±0,04 ^{Ba}
tt-farnesol (100 µL)	0,13±0,03 ^{Ac}	0,24±0,04 ^{Ab}	0,23±0,04 ^{Ab}	0,21±0,06 ^{Ab}	0,31±0,05 ^{ABa}
Apigenina (100 µL)	0,14±0,03 ^{Ac}	0,23±0,02 ^{Abc}	0,28±0,07 ^{Aab}	0,29±0,02 ^{Aab}	0,35±0,06 ^{Aa}
tt-farnesol + Apigenina	0,14±0,03 ^{Ac}	0,18±0,03 ^{Abc}	0,20±0,03 ^{Abc}	0,28±0,05 ^{Aa}	0,23±0,06 ^{Bab}

Os dados estão apresentados em média±desvio padrão da média. Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa entre os tempos (pós-teste de Tukey, $p<0,05$).

Com exceção do grupo dexametasona, em que não foram observadas diferenças entre os volumes nos diferentes momentos (teste ANOVA de uma via de medidas repetitivas, $p=0,072$), todos os demais grupos apresentaram variação significativa no edema com o decorrer do tempo (teste ANOVA de uma via de

medidas repetitivas, $p < 0,001$). Notar que apenas os animais que receberam dexametasona e a associação apigenina + tt-farnesol mostraram patas menos edemaciadas (40% e 35% respectivamente) no final do tempo experimental, em relação à apigenina. Estes resultados estão ilustrados no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Volumes, em mL, referentes ao edema de pata dos animais submetidos à inoculação das diferentes substâncias.* Diferença significativa em relação aos demais grupos.



A Tabela 2 mostra a análise relacionada à contagem total de neutrófilos. O teste ANOVA de uma via revelou diferenças significativas ($p < 0,001$) entre os grupos experimentais. Notar que os animais que receberam carragenina, substância indutora de inflamação, apresentaram a contagem de neutrófilos, significativamente maior que nos demais grupos (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$). Novamente, o destaque foi para os animais que receberam a associação apigenina + tt-farnesol, os quais

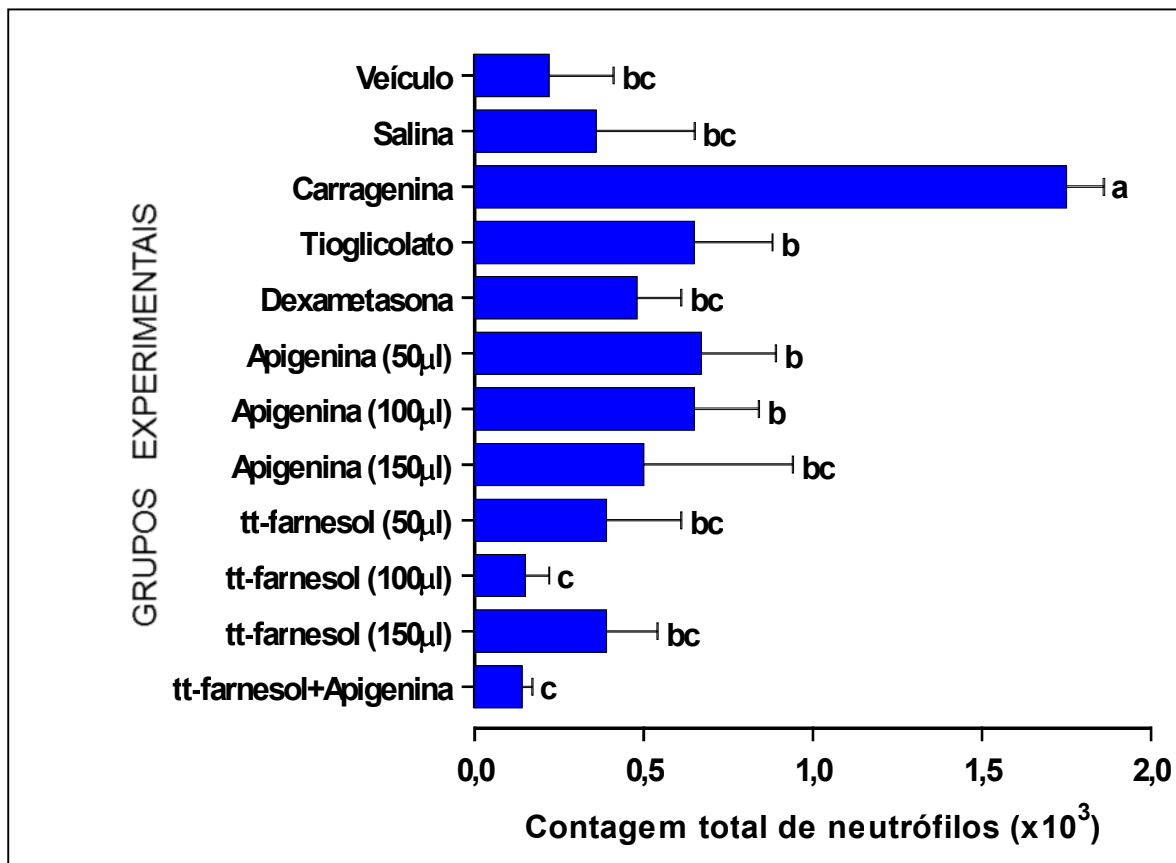
apresentaram contagem de neutrófilos significativamente menores que os animais dos demais grupos. Estes resultados estão ilustrados no Gráfico 2.

Tabela 2 – Contagem de neutrófilos em camundongos Swiss após inoculação das substâncias controles e experimentais

Grupos	Contagem total de neutrófilos x 10³
Veículo	0,22±0,19 ^{bc}
Salina	0,36±0,29 ^{bc}
Carragenina	1,75±0,11 ^a
Tioglicolato	0,65±0,23 ^b
Dexametasona	0,48±0,13 ^{bc}
Apigenina (50 µL)	0,67±0,22 ^b
Apigenina (100 µL)	0,65±0,19 ^b
Apigenina (150 µL)	0,50±0,44 ^{bc}
tt-farnesol (50 µL)	0,39±0,22 ^{bc}
tt-farnesol (100 µL)	0,15±0,07 ^{bc}
tt-farnesol (150 µL)	0,28±0,13 ^{bc}
tt-farnesol+Apigenina	0,14±0,03 ^c

Os dados estão apresentados em média±desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, p<0,05).

Gráfico 2 - Contagem de neutrófilos nos grupos avaliados. Cada barra representa a média e a barra de erro, o desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).



Na Tabela 3 são apresentados os resultados sobre a avaliação da quantidade de células íntegras (macrófagos) e tumorais (células de tumor ascítico de Ehrlich - TAE), nos diferentes meios de cultura, em cada um dos momentos analisados (24, 48 e 72 horas).

Em relação às células íntegras, o teste ANOVA de duas vias revelou que houve efeito do momento de análise ($p=0,001$), do meio de cultura ($p<0,001$), e interação significativa entre ambas ($p<0,001$). Como houve interação entre os fatores (momento de análise e meio de cultura), todas as múltiplas comparações foram realizadas pelo pós-teste de Tukey.

Tabela 3 – Níveis de absorvância referentes à viabilidade de células íntegras e tumorais avaliadas em diferentes momentos e meios de cultura

Tipos de células	Tempos de cultura (horas)		
	24	48	72
Células íntegras (macrófagos)			
Meio	0,081±0,009 ^{Ab}	0,035±0,004 ^{Bbc}	0,039±0,008 ^{Bc}
Far 5 µL	0,042±0,016 ^{Ad}	0,050±0,005 ^{Aabc}	0,046±0,002 ^{Ac}
Far 15 µL	0,024±0,013 ^{Bd}	0,068±0,002 ^{Aa}	0,059±0,010 ^{Ab}
Far 30 µL	0,020±0,004 ^{Bd}	0,068±0,012 ^{Aa}	0,062±0,018 ^{Aabc}
Api 5 µL	0,133±0,010 ^{Aa}	0,029±0,003 ^{Cbc}	0,073±0,006 ^{Bab}
Api 15 µL	0,069±0,014 ^{Ab}	0,052±0,012 ^{Aa}	0,054±0,008 ^{Ab}
Api 30 µL	0,046±0,007 ^{Ac}	0,026±0,003 ^{Bc}	0,048±0,005 ^{Ab}
Far 15+Api 15	0,022±0,005 ^{Cd}	0,048±0,004 ^{Ba}	0,087±0,028 ^{Aa}
Veí 15 µL	0,030±0,004 ^{Bd}	0,066±0,002 ^{Aa}	0,068±0,002 ^{Aab}
Células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE)			
Meio	1,065±0,046 ^{Aa}	0,893±0,142 ^{Ba}	0,900±0,025 ^{Ba}
Far 5 µL	1,025±0,068 ^{Aab}	0,771±0,075 ^{Bab}	0,755±0,079 ^{Bab}
Far 15 µL	0,908±0,179 ^{Aab}	0,850±0,037 ^{Bab}	0,843±0,046 ^{Bab}
Far 30 µL	0,927±0,124 ^{Aab}	0,749±0,095 ^{Bab}	0,712±0,066 ^{Bab}
Api 5 µL	0,920±0,023 ^{Ab}	0,739±0,099 ^{Bb}	0,662±0,051 ^{Bb}
Api 15 µL	0,994±0,014 ^{Aab}	0,684±0,085 ^{Bab}	0,784±0,077 ^{Bab}
Api 30 µL	0,878±0,259 ^{Aab}	0,837±0,028 ^{Bab}	0,818±0,100 ^{Bab}
Far 15+Api 15	0,977±0,085 ^{Aab}	0,805±0,150 ^{Bab}	0,740±0,053 ^{Bab}
Veí 15 µL	0,804±0,051 ^{Ab}	0,910±0,036 ^{Bb}	0,610±0,030 ^{Bb}

Os dados estão apresentados na forma de média±desvio padrão da média, em relação à absorvância no *TP reader* (modo ELISA), corrigidos em relação ao valor do meio de cultura controle. Nas linhas, letras maiúsculas diferentes entre si indicam diferença significativa entre os tempos de cultura (pós-teste de Tukey). Nas colunas, letras minúsculas diferentes entre si indicam diferença significativa (pós-teste de Tukey) entre as substâncias. Para as células TAE, foi realizada a comparação entre os tempos de cultura com as substâncias agrupadas e a comparação entre as substâncias, com os tempos de cultura agrupados, uma vez que não houve interação entre os fatores tempo e substância, no teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas (p=0,061).

Para as células colocadas em cultura com apigenina, a resposta em relação à viabilidade das células não foi tão evidente e constante. Nas doses de 5 µL

e 30 μ L, a menor viabilidade foi observada após 48 horas, e na dose de 15 μ L não houve diferença entre os momentos de análise, em relação à viabilidade das células, mostrando, para essa dose, uma possível prevenção da perda da viabilidade celular. O melhor resultado foi observado na combinação entre tt-farnesol 15 μ L e apigenina 15 μ L, com um aumento gradativo da viabilidade das células no decorrer do tempo. Nas comparações entre os meios de cultura em cada um dos momentos, se destacam a maior viabilidade das células nas culturas apigenina 5 μ L, no momento 24 horas e na combinação entre tt-farnesol 15 μ L e apigenina 15 μ L, no momento de 72 horas. Todavia, nesse momento, não houve diferença entre a combinação de meios e o tt-farnesol 30 μ L, apigenina 5 μ L e veículo 15 μ L.

De forma geral, para as células tumorais, a viabilidade das mesmas diminuiu no decorrer do tempo, independente do meio de cultura utilizado, sendo observada uma diminuição significativa da viabilidade das células entre o momento 24 horas e os momentos 48 e 72 horas. Na comparação entre os meios, agrupando os dados em relação aos diferentes momentos avaliados, a única diferença observada foi que a viabilidade das células do meio apenas, foi maior do que aquela observada para os meios apigenina 5 μ L e veículo 15 μ L. Os resultados mostrados na Tabela 3 estão ilustrados nos Gráficos 3 e 4.

Gráfico 3 - Absorbância no *TP reader* (modo ELISA) corrigidos em relação ao valor do meio de cultura controle em células íntegras (macrófagos). Cada coluna representa a média e a barra o desvio padrão da média.

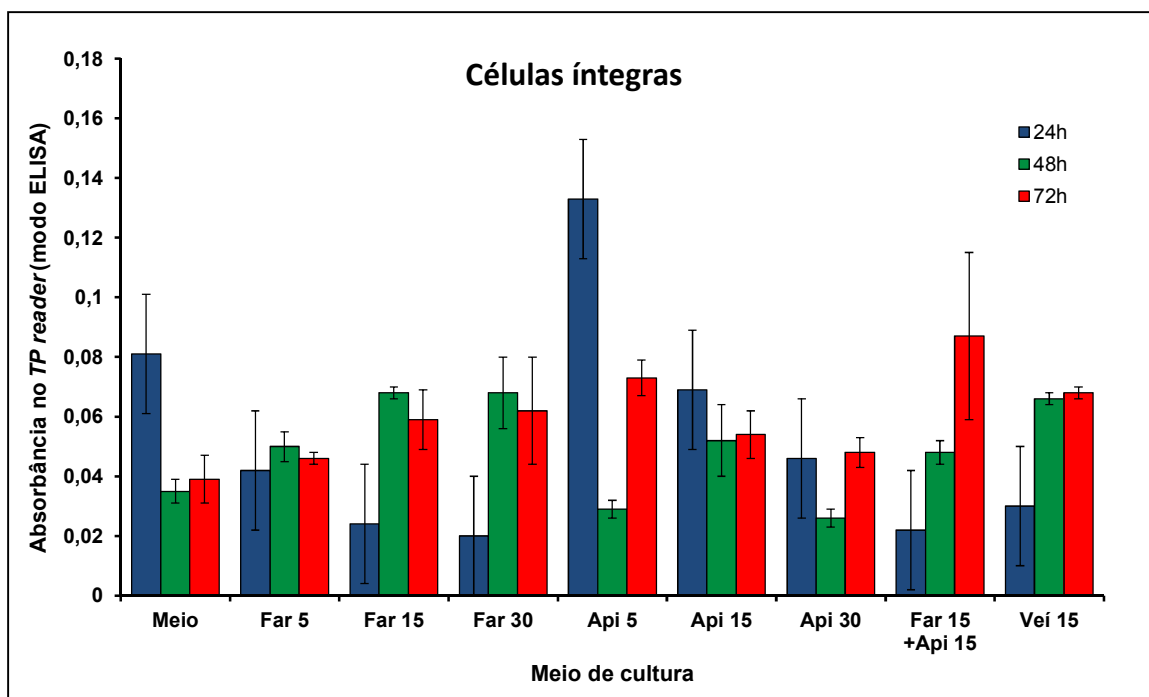
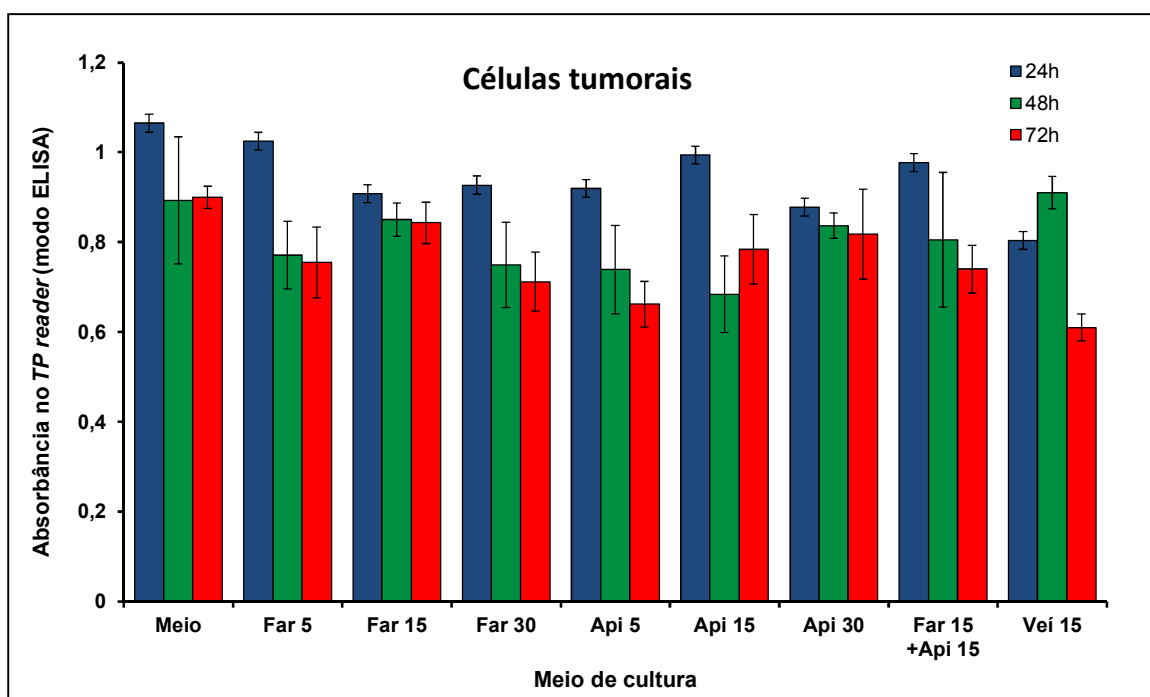


Gráfico 4 - Absorbância no *TP reader* (modo ELISA), corrigidos em relação ao valor do meio de cultura controle em células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Cada coluna representa a média e a barra o desvio padrão da média.



6 DISCUSSÃO

Os resultados do nosso estudo mostraram que a apigenina e o tt-farnesol apresentam ação anti-inflamatória e células em contato com essas substâncias mantêm-se viáveis. Isso indica que estudos clínicos com esses polifenóis podem ser desenvolvidos, abrindo possibilidades para seu uso terapêutico.

A primeira etapa a fim de obter conclusões válidas foi a escolha da metodologia. Estudos *in vitro* com cultura de células e teste secundários com animais são modelos experimentais recomendados, de acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO, 1992). Ainda, a execução de testes laboratoriais possibilita avaliar a atuação ou efeito de determinada substância isoladamente ou em associação (FRESHNEY, 2011).

Para verificar a ação anti-inflamatória das substâncias experimentais – apigenina e tt-farnesol – lançamos mão de dois modelos. A contagem de neutrófilos polimorfonucleares, visto serem as primeiras células que adentram o local agredido, e o edema de pata, que traduz um dos sinais cardeais da inflamação, referente à tumefação localizada consequente ao aumento da permeabilidade vascular que acarreta o extravasamento de exsudato para o interstício (SIQUEIRA JÚNIOR, 2000).

A cultura celular é considerada uma metodologia segura para a compreensão da atividade das células frente a produtos testados, desde que haja uma padronização dos critérios metodológicos e na avaliação dos resultados. Como já citado, o ensaio *in vitro* é o primeiro passo na sequência de testes a serem realizados a fim de comprovar a biocompatibilidade de uma substância ou produto e sua futura experimentação clínica (HANKS, 1996; BURDOCK, 1998).

Na verificação da ação anti-inflamatória são utilizados diversos métodos *in vitro* e *in vivo* (COUTINHO *et al.*, 2009). Em ensaios *in vivo*, são utilizados agentes indutores de inflamação, tioglicolato e carragenina conforme metodologia preconizada por Winter *et al.* (1962); em animais de laboratório são utilizados visando avaliar se os flavonoides são capazes de inibir/reduzir a migração das células de defesa e a formação de edema (JEONG *et al.*, 2009).

A necessidade de investigarmos essas duas substâncias baseou-se no fato de que, embora haja relatos de flavonoides que apresentam ações antibacteriana (GEBARA *et al.*, 1996; STEINBERG *et al.*, 1996; KOO *et al.*, 1999; ISLA *et al.*, 2005; KOO;JEON, 2009; LIBÉRIO *et al.*, 2009), antioxidante (BANKOVA *et al.*, 1995; NAGAI *et al.*, 2001), antiviral (ITO *et al.*, 2001) e anti-inflamatória do extrato da própolis (YOON; BAEK, 2005; JEONG *et al.*, 2009), não encontramos na literatura estudos que avaliassem a apigenina e o tt-farnesol em relação às variáveis aqui propostas, respeitando-se os critérios para experimentação *in vivo* ou clínica de novos fármacos ou substâncias.

Para a padronização dos grupos experimentais, em todos os testes foi utilizada a concentração de 1,33 mM para as duas substâncias, tendo em vista ser a menor concentração utilizada em experimento com animais, no qual mostrou ação antimicrobiana contra *S. mutans* (KOO *et al.*, 2003a) e atuação sobre GTF (KOO *et al.*, 2003b). Esse quesito foi estabelecido a fim de se evitar um viés caso uma concentração maior tivesse sido utilizada, tendo-se em vista a literatura relatar atividade biológica das substâncias na concentração referenciada neste estudo.

Como citado anteriormente, o teste de edema de pata traduz a tumefação localizada do tecido inflamado. Quanto maior o volume correspondente ao deslocamento de água no pletismômetro, maior a inflamação ainda presente, menor

a capacidade anti-inflamatória da substância. Os resultados mostrados na Tabela 1 revelam que até duas horas após a indução da inflamação, nenhuma das substâncias (controle, veículo e substâncias experimentais) foi capaz de inibir a inflamação. Observou-se que o edema foi similar ($p > 0,05$, pós-teste de Tukey) em todos os grupos. Somente no tempo de 240 minutos é que a associação apigenina + tt-farnesol mostrou-se tão eficaz em reduzir o edema quanto a dexametasona, ambas superiores às demais ($p < 0,05$), sugerindo eficiência do tratamento em comparação aos outros grupos. Entretanto, o resultado tardio sugere ser justificado em função da baixa concentração utilizada.

A dexametasona é um glicocorticoide que age principalmente na inibição da transcrição do gene da enzima ciclo-oxigenase-2 e indução da proteína lipocortina, inibidora da enzima fosfolipase A_2 . Também reduz a produção do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1), citocinas pró-inflamatórias (KIM *et al.*, 2004). Outro grupo de fármacos são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) que agem inibindo a COX, impedindo a formação de prostaglandinas e tromboxanos, mediadores do processo inflamatório. Nosso estudo não se deteve em verificar o mecanismo de ação das substâncias experimentais e associação em relação à ação anti-inflamatória, mas o desempenho similar à dexametasona (Tabela 1) pode indicar que o mecanismo de ação se assemelhe a essa droga. Há relatos que flavonoides em geral inibem a proliferação de linfócitos T e citocinas pró-inflamatórias (ex.: TNF- α e IL-1), assim como modulam a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como a fosfolipase A_2 . Mecanismos como modulação de neutrófilos, inibição da produção de citocinas inflamatórias, inibição da enzima formadora de NO, modulação das enzimas COX e lipo-oxigenase são atribuídos a vários flavonoides, inclusive a apigenina, mas não ao tt-farnesol, o que não significa

que este não possa apresentar alguns desses mecanismos. De forma geral, em relação à variável edema de pata, o grupo experimental representado pela associação apigenina + tt-farnesol apresentou a melhor ação anti-inflamatória, comparada à dexametasona, fármaco de uso consagrado.

As aplicações de componentes da própolis se destacaram no uso contra processos inflamatórios e, contraditoriamente, contra úlceras gástricas (MIEAN; MOHAMED, 2001; SFORCIN; BANKOVA, 2011), sendo que os medicamentos mais utilizados (AINEs) pecam justamente pelos danos que causam à mucosa gastrintestinal. A presença dessas substâncias desempenha um papel fundamental nos efeitos terapêuticos observados em nosso trabalho.

Esse resultado da associação foi confirmado no teste de contagem de neutrófilos, ou seja, o grupo apigenina + tt-farnesol apresentou a menor contagem de neutrófilos ($0,14 \pm 0,03 \times 10^3$ células), com diferença estatística ($p < 0,05$, pós-teste de Tukey) de todos os demais grupos, especialmente do grupo carragenina ($1,75 \pm 0,11 \times 10^3$ células). As referências foram os grupos do tioglicolato e da carragenina, substâncias indutoras da inflamação; nesses grupos, a contagem de neutrófilos não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação aos grupos apigenina 50 μ L e apigenina 100 μ L, ou seja, não houve resultados satisfatórios nesses grupos experimentais.

A análise da Tabela 2 nos mostra que nas quantidades de 50 μ L e 100 μ L, a apigenina apresentou mesmo desempenho na contagem de neutrófilos que a substância indutora de inflamação, o tioglicolato ($p > 0,05$), ou seja, nessas quantidades, a apigenina não foi capaz de exercer ação terapêutica. Resultado dessemelhante foi observado em relação ao tt-farnesol nas três quantidades testadas; este flavonoide mostrou mesmo desempenho que a dexametasona

($p > 0,05$) e apigenina 150 μL . Logo, podemos inferir que a ação anti-inflamatória da apigenina, diferentemente do tt-farnesol, está ligada à dose utilizada. Vale lembrar que a apigenina foi reconhecida como moduladora/inibidora na formação de mediadores e enzimas envolvidas na inflamação em ensaios *in vitro* realizados em cultura de células (BANKOVA *et al.*, 1995; COUTINHO *et al.*, 2009). Portanto, o melhor desempenho apresentado pela associação, justifica-se pela interação e efeito sinérgico. Esses resultados são corroborados por Santangelo *et al.*, (2007) que mencionaram a interação entre polifenóis.

Interessante observar a ação do tt-farnesol, mesmo quando avaliadas outras propriedades. Ainda que em concentração inferior a 1,33 mM, este flavonoide mostrou efeito inibidor potente sobre a síntese de glucanos e na produção de ácido pelas células de *S. mutans* (KOO;JEON, 2009), corroborando com dados de outros estudos (KOO *et al.*, 2002; KOO *et al.*, 2005). Essa concentração foi adotada como padrão em nosso estudo devido ser a menor concentração na qual foi observada atividade biológica positiva. Sua capacidade anti-inflamatória, até então não avaliada, indicou que o tt-farnesol é um promissor agente terapêutico de origem natural e que, no futuro, poderá ser avaliado clinicamente em relação à diferentes fenômenos fisiopatológicos.

A fim de consolidar essa análise, lançamos mão do teste de viabilidade celular. O método de exclusão pelo Azul de Trypan para a contagem de células se fez necessário antes da cultura das células pelo fato de analisar a integridade da membrana plasmática. Sua alteração é atribuída à morte celular, tanto por apoptose, quanto por necrose. A redução da viabilidade celular analisada pela metabolização do MTT é um indicativo de redução da proliferação celular, indução de morte celular

ou ocorrência de ambos os processos simultaneamente. Ressalta-se a vantagem de ser um método reprodutível e objetivo ao que se propõe (MOSSMAN, 1983).

De forma geral, para as células íntegras, a viabilidade das células colocadas em cultura apenas no meio padrão diminuiu no decorrer do tempo. Foi observada uma diminuição significativa da viabilidade das células entre o momento 24 horas e os momentos 48 e 72 horas. Esta perda na viabilidade foi prevenida na cultura com tt-farnesol. O tempo experimental de 24 horas apresentou redução nos níveis de absorbância estatisticamente significativa, fato preocupante quando se trata de citotoxicidade e viabilidade celular, o mesmo no trabalho de Kujumgiev *et al.*, (1999), onde observaram que 50% das células sofreram alteração morfológica e foram incubadas nos mesmos períodos experimentais (24, 48 e 72 horas).

No entanto, podemos responsabilizar essa redução acentuada ao prejuízo metabólico medido pela atividade mitocondrial, pois nos tempos experimentais de 48 e 72 horas, essa redução não foi observada. Portanto, as substâncias testadas alteram o metabolismo celular, mas não as inviabilizam, pois o teste do MTT é um experimento que avalia a atividade metabólica da célula e foi demonstrado que a interfere em diversas propriedades mitocondriais (YOKOMIZO, 2001).

Deve-se reiterar que a linhagem celular utilizada foi a mesma, com padronização na manipulação e iguais tempos de incubação e cultivo. A resposta para essa diferença pode suscitar a ideia de que as substâncias devam ser utilizadas ou prescritas em intervalo de dois dias, o que concederia tempo hábil para a recuperação da atividade celular. Uma das hipóteses que pode ser sugerida é que o efeito sobre a mitocôndria seria decorrente da interação de componentes da membrana com espécies reativas de oxigênio formadas através de reações não-enzimáticas. Analisado o grupo controle, constatamos também que o grupo em que

utilizamos o solvente DMSO não demonstrou efeito significativo, com valores semelhantes às substâncias estudadas, assegurando seu uso sem interferir ou comprometer o experimento, conforme o estudo de Marcucci *et al.* (2001).

O teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, em relação às células tumorais, indicou que houve efeito do momento de análise ($p < 0,001$), porém, não houve interação significativa (momento de análise – $p = 0,061$). Neste caso, os momentos de análise foram comparados entre si, pelo pós-teste de múltiplas comparações de Tukey, com os meios agrupados (Tabela 3 – letras maiúsculas).

O controle e a manutenção dessa proliferação celular traduzem a inocuidade ou efeito deletério das substâncias utilizadas sobre células íntegras. Ao mesmo tempo, a redução das células tumorais é considerada uma estratégia para prevenir ou retardar o crescimento tumoral, o que não pode ser observado neste ensaio. Estudos indicam que o extrato etanólico da própolis pode matar as células cancerígenas diretamente pela indução de apoptose celular ou necrose (MARCUCCI, 1995; MARCUCCI, 1996). Nossos resultados não demonstraram esse fato, apesar da redução dos níveis de absorbância nas células tumorais (Tabela 3). A diminuição desses níveis indicou queda na concentração de células, porém, pouco significativa, o que confere às substâncias um efeito citostático nas células tumorais.

Do mesmo modo, o efeito protetor do farnesol descrito por Joo e Jetten (2010) refere-se à inibição no início do câncer pulmonar. Essa inibição do crescimento e indução de apoptose celular pode ser parte do mecanismo pelo qual o farnesol exerce efeitos antitumorais na progressão dessa patologia, embora os autores tenham utilizado uma concentração menor em relação ao nosso estudo (30 mM). Não podemos confirmar essa afirmativa com o presente trabalho; os resultados não foram estatisticamente significantes para que fizéssemos essa inferência do produto,

pois os dois tipos celulares utilizados continuaram viáveis nos períodos experimentais

Nosso estudo corrobora com uma importante afirmação de Newman *et al.*, (2003), Koehn e Carter (2005), Newman e Cragg (2007) e, recentemente, com Sforcin e Bankova (2011): investigações sobre os componentes da própolis é um campo emergente sobre a aplicabilidade de produtos naturais. Os problemas quanto à complexidade da composição da própolis e suas implicações nas ações terapêuticas, aos poucos, estão sendo solucionados. Cada estudo, a exemplo deste, que mostra a possibilidade do uso isolado de constituintes, representa um avanço significativo na questão da biocompatibilidade e do uso clínico.

Demonstrar que apigenina e o tt-farnesol, especialmente quando associados, apresentam capacidade anti-inflamatória e não agredem o tecido, representa o aval para os estudos clínicos com estas substâncias. Estabelecemos importante requisito para a instalação de novos fármacos, algumas vezes não observado em outras investigações.

Reproduzir os testes primários e secundários utilizados neste trabalho nos fornecerá respaldo para a utilização de concentrações da apigenina e do tt-farnesol, e tempos experimentais maiores, podendo indicar uma posologia para seu uso terapêutico, pois verificamos uma ação biológica com os componentes isolados e um efeito sinérgico entre os mesmos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitem concluir que:

- A apigenina e o tt-farnesol são substâncias que, devido à capacidade anti-inflamatória *in vivo* e ausência de citotoxicidade, estão indicadas para estudos clínicos;
- Por meio do modelo de migração de neutrófilos e pelo teste de edema de pata, podemos afirmar que a apigenina e o tt-farnesol apresentam ação anti-inflamatória;
- A apigenina e o tt-farnesol mantiveram viáveis as células íntegras e tumorais.

REFERÊNCIAS¹

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1998. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/7122b3804745869c8feadf3fbc4c6735/Relatorio_5_anos_DEFINITIVO.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 7 outubro 2011.

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa aumenta controle sobre a venda de anti-inflamatórios). 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/05/1108_1.htm>. Acesso em: 7 outubro 2011.

Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D, Huertas AA, Kadota S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scav-enging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J Ethnopharmacol. 2000; 72(1):239–46.

Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. Zeit fur Natur. 1995; 50(3/4):167-72.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. In: CATEF: Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos. Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis. [Brasília], 2005. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/cafet/index.htm>. Data de acesso: 04/06/2012

¹ Conforme International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver style) – grupo Vancouver

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol. 1998; 36(4):347-63.

Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. Rev Virtual Quim. 2009; 1(3):241-56.

Freshney RI. Cytotoxicity. In: Culture for animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6 ed. Indianápolis: Wiley-Blackwell; 2011. p.365-81.

Gebara ECE, Zardetto CGC, Mayer MPA. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. Rev Odontol Univ São Paulo. 1996; 10(4):251- 6.

Ghisalberti EL. Propolis: a review. Bee World. 1979; 60:59–84.

Hanks CT, Strawn SE, Wataha JC, Craig RG. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. 1991; 70(11):1450-5.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: A review. Dental materials. 1996; 12(3):186-93.

Hyakuna K, Yamamuro T, Kotoura Y, Kakutani Y, Kitsugi T, Takagi H. The influence of calcium phosphate ceramics and glass-ceramics on cultured cells and their surrounding media. J Biomed Mater Res. 1989; 23(9):1049-66.

International Standard Organization. ISO 10993: 1-6. Biological evaluation of medical and dental materials and devices. 1992.

Isla MI, Paredes-Guzman JF, Nieva-Moreno MI, Koo H, Park YK. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. J. Agric. Food Chem. 2005; 53(4):1166–72.

Ito J, Chang FR, Wang HK, Park YK, Ikegaki M, Kilgore N, Lee KH. Anti-AIDS agents: Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new mellifore-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. J. Nat. Prod. 2001; 64(10):1278-81.

Jeong GS, Lee SH, Jeong SN, Kim YC, Kim EC. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. Int Immuno. 2009; (9):1374–80.

Joo JH, Jetten AM. Molecular mechanisms involved in farnesol-induced apoptosis. Cancer Lett. 2010; 287(2):1-26.

Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J Pharmacol Sci. 2004; 96(3):229-45.

Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2005; 4:206-20.

Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J Antimicrob Chemother. 2003a; 52(5):782-9.

Koo H, Jeon JG. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. Adv Dent Res. 2009; 21:63-8.

Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol*. 2003b; 17:337-43.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *S. mutans* growth and on glucosyl-transferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46(5):1302-9.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res*. 1999; 33:393–400.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on *S. mutans* biofilms and dental caries. *J Dent Res*. 2005; 84(11):1016-20.

Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999; 64:235–40.

Libério SA, Pereira ALA, Araújo MJAM, Dutra RP, Nascimento FRF, Monteiro-Neto V, Ribeiro MNS, Gonçalves AG, Guerra RNM. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol*. 2009; 125:1–9.

Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995; 26:83–99.

Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quím. Nova*. 1996; 19(5):529-36.

Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2001; 74:105–12.

Menezes H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol*. 2005; 72(3):405-11.

Miean KH, Mohamed S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) content of edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem*. 2001; 49:3106–12.

Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55-63.

Muñoz O, Peña RC, Ureta E, Montenegro G, Caldwell C, Timmermann BN. Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z. Naturforsch*. 2001; 56:273-4.

Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chem*. 2001; 75:237-40.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod*. 2003; 66(7):1022-37.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007; 70(3):461-77.

Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na Odontologia. *Braz J Pharmacogn*. 2007; 17(3):466-76.

Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50(9):2502–6.

Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino MLF. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* 2011; 28:925-36.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Fiesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanità.* 2007; 43(4):394-405.

Secco DD, Paron JA, Oliveira SHP, Ferreira SH, Silva JS, Cunha FQ. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide.* 2003; 9(3):153-64.

Sforcin JM, Bankova V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 2011; 133:253–60.

Sforcin JM, Fernandes Junior A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 73(1/2):243-9.

Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Orig article.* 2007; 5(3):313–6.

Siqueira Júnior JF. Inflamação aguda: resposta vascular e celular. In: Siqueira Júnior JF, dantas CJS. *Mecanismos celulares da inflamação.* Rio de Janeiro: Ed. Médica Científica Ltda; 2000. p. 73-82.

Steinberg D, Kaine G, Gedalia I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. Am. J. Dentistry. 1996; 9(6):236-9.

Unnanuntana A, Bonsignore L, Shirliff ME, Greenfield EM. The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts - An *in vitro* study. J Bone Joint Surg Am. 2009; 91(11):2683-92.

Wang W, Weng XC, Cheng DL. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. Food Chem. 2000; 71:45–9.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-induced oedema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. Proc Soc. Exp. Biol. Ther. 1962; 111:544-7.

Yokomizo AY. Obtenção de antígeno viral a partir de cultura de células *VERO* em microcarreadores porosos [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo/IPT Instituto Butantan; 2001.

Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. Yonsei Med J. 2005; 46(5):585-96.

Zhang L, Chan C. Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (MSCs) and separation of single-colony derived MSCs. 2010. Disponível em: <http://www.jove.com/index/details.stp?id=1852>

GLOSSÁRIO¹

Alquilação: é a transferência de um grupo alquila de uma molécula para outra. O grupo alquila pode ser transferido como um carbocátion alquídico, um radical livre, um carbânion ou um carbeno (ou seus equivalentes). Em medicina, a alquilação de DNA é utilizada em quimioterapia para danificar o DNA das células cancerosas.

Flavonoides: é a designação dada a um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, componentes de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies vegetais. Os diferentes tipos de flavonoides são encontrados em frutas, flores e vegetais em geral, assim como em alimentos processados como chá e vinho.

Fosforilação: em bioquímica, é a adição de um grupo fosfato (PO_4) a uma proteína ou outra molécula. A fosforilação é um dos principais participantes nos mecanismos de regulação das proteínas.

Glicolisação: é uma reação química onde um carboidrato é adicionado a outra molécula, chamada de receptora. Na biologia glicosilação se refere ao processo enzimático que une glicanos a lípidios, proteínas ou outras moléculas orgânicas.

Oligomerização: processo químico que somente converte monômeros a um finito grau de polimerização.

¹ www.infopedia.pt/termos-medicos/bioquimica

Polifenóis: são substâncias caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático. Então, são fenóis, porém podem apresentar um ou mais grupos hidroxila e mais de um anel aromático. Geralmente os polifenóis são substâncias naturais encontradas em plantas, tais como flavonoides, taninos, lignanas, derivados do ácido cafeico, dentre outras. Muitas destas substâncias são classificadas como antioxidantes naturais e possuem propriedades terapêuticas, estando presentes em alimentos e plantas medicinais.

APÊNDICE – Sequência de plaqueamento

[illegible]

ANEXO

Carta de aprovação



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais /CEUA

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 386 do Pesquisador Edilson José Zafalon referente ao projeto de pesquisa, **“Ação anti-inflamatória e citotoxicidade da apigenina e TT-Farnesol”**, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária de 9 de novembro de 2011.

Dr^a Uoice Stein

Coordenadora da CEUA

Campo Grande, 11 de novembro de 2011.