CLARISSA ROCHA MARTINEZ

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* SOBRE FIBROBLASTOS DE MUCOSA BUCAL HUMANA: ESTUDO IN VITRO

CAMPO GRANDE
2011

CLARISSA ROCHA MARTINEZ

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* SOBRE FIBROBLASTOS DE MUCOSA BUCAL HUMANA: ESTUDO IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Zárate

CAMPO GRANDE
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

CLARISSA ROCHA MARTINEZ

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* SOBRE FIBROBLASTOS DE MUCOSA BUCAL HUMANA: ESTUDO IN VITRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

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

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira

Instituição : FAODO (UFMS)

_____

Prof. Drª. Rosana Mara Giordano de Barros

Instituição: FAODO (UFMS)

_____

Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva

Instituição: FAODO (UFMS)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Zara, por dar-me força e coragem, com suas palavras incentivadoras. Agradeço por esse laço familiar que nos unirá eternamente. Ao meu pai, Antonio, pelo amor incondicional. Amo vocês.

Ao meu esposo, João Carlos, por estar presente ao meu lado em todos os momentos nessa jornada. Seu contínuo apoio e carinho me ajudou a realizar várias conquistas até aqui.

Aos meus irmãos, Mauricio e Fernando, pela amizade e convivência durante tantos anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar tantas pessoas boas em meu caminho, iluminando cada passo nessa caminhada. Obrigada senhor, pela realização deste sonho;

Ao Professor Dr. Paulo Zárate por acreditar em mim, por apoiar minhas decisões em alguns momentos decisivos de minha vida, pela compreensão e pela excelente orientação recebida. Apesar do pouco contato, quero que saiba que te admiro por seu caráter, humildade e simplicidade;

Às professoras Rosana Mara Giordano de Barros e Ângela Hassessian, que me proporcionaram oportunidades incríveis de crescimento profissional, pelos bons anos de convivência, pela confiança, carinho e tenho certeza, por sempre desejarem o melhor para mim. Muito obrigada!

À professora Sônia Gagiotti, pelos ensinamentos sobre cultura celular;

À Dona Balbina, mãe da professora Ângela, pela moradia aconchegante (lá em São Paulo), indispensável para a realização deste trabalho;

Às técnicas, Adriana e Sandra, pessoas maravilhosas, que trabalharam comigo e que foram de fundamental importância para a realização da parte experimental desta pesquisa;

Ao professor Dr. Joaquim Corsino que sempre esteve disposto a ajudar-me. Obrigada pela essencial ajuda e presteza na análise química deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao programa de Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste pela formação e oportunidade de crescimento profissional;

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Quando pensamos que temos

todas as respostas, vem a vida

e muda todas as perguntas”.

(Autor desconhecido)

RESUMO

Martinez CR. **Caracterização química e citotoxicidade da própolis de *Apis mellifera* sobre fibroblastos de mucosa bucal humana: estudo in vitro.** Campo Grande; 2010. [Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A própolis é um produto resinoso com diversas propriedades biológicas comprovadas cientificamente. Porém, poucos estudos foram realizados com o propósito de testar a citotoxicidade da mesma em células dos tecidos onde é empregada. Na cavidade bucal, os fibroblastos são muito importantes na regeneração tecidual e diretamente afetados durante diversos tratamentos que utilizam a própolis. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade de soluções hidroalcoólicas de própolis, oriunda de Mato Grosso do Sul, com e sem propilenoglicol, sobre fibroblastos de mucosa jugal humana, em experimentos de viabilidade celular a curto e longo prazo e, além disso, propõe-se analisar quimicamente o extrato de própolis. No teste a curto prazo, foram testadas as concentrações de 1%; 0,5%; 0,1%; 0,01% e 0,001%, sendo as três últimas também testadas no experimento a longo prazo. Os resultados foram comparados pelo método ANOVA, complementado pelo teste de Tukey, considerando $p<0,05$. A curto prazo, as soluções com própolis, independente do veículo, a 0,5% e 1% foram citotóxicas sendo responsáveis por mais de 50% de morte celular. As soluções e os veículos a 0,001%; 0,01% e 0,1% mostraram-se biocompatíveis. Os resultados do teste a longo prazo, mostraram que todas as soluções de própolis com propilenoglicol, foram biocompatíveis aos fibroblastos, porém, houve significativa morte celular após 7 dias. As soluções de própolis sem propilenoglicol foram biocompatíveis *in vitro*, não apresentando significativa morte celular com o passar do tempo. Quatro substâncias químicas - lupeol, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C®), 5,7-diidroxi-4'-metoxiflavone (acacetina) e 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavonol foram identificadas pela análise química. Conclui-se que a citotoxicidade da própolis foi dependente da concentração utilizada e que o propilenoglicol utilizado no experimento a longo prazo, apresentou efeitos indesejáveis visto que causou maior porcentagem de morte celular com o passar do tempo.

Palavras-chave: cultura celular, biocompatibilidade, própolis.

ABSTRACT

Martinez CR. **Cytotoxicity of propolis of *Apis mellifera* on human buccal mucosa fibroblasts: study in vitro.** Campo Grande; 2010. [Dissertation – Federal University of Mato Grosso do Sul].

The propolis is a resinous substance with many scientifically comproved biological properties. However, few studies have been conducted with the purpose of testing its cytotoxicity in cells from tissues where it is applied. In the oral cavity, the fibroblasts are very important in tissue regeneration and directly affected during various treatments using propolis. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of propolis hydroalcoolic solutions from Mato Grosso do Sul, with and without propylene glycol, on the fibroblasts of human buccal mucosa, in short and long term experiments of celular viability, and analyse chemically the extract of propolis. In the short-term test, the concentrations of 1%, 0,5%; 0,1%; 0,01% and 0,001% were tested and the last three ones also tested in the long-term experiment. The results were compared by ANOVA method, complemented by Tukey test considering $p<0.05$. The short-term solutions with propolis, regardless of the vehicle, 0,5% and 1% were cytotoxic accounting for more than 50% cell death. The solutions and vehicles of 0,001%; 0,01% and 0,1% were biocompatible. The results of the long-term test showed that all propolis solutions with propylene glycol were biocompatible to fibroblasts, however, there was significant cell death after 7 days. The solutions of propolis without propylene glycol were biocompatible *in vitro*, no presenting significant cell death over time. Four chemical substances - lupeol, 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C®), 5,7-diidroxy-4'-methoxyflavone (acacetina) and 3,5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavonol were identified by chemical analysis. It was possible to infer that the cytotoxicity of propolis depended on the concentration used and the propylene glycol in the long-term experiment presented indesirable effects because of its higher cell death percentage in the course of time.

Key-words: cell culture, biocompatibility, propolis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de células viáveis submetidas às diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis, com e sem propilenoglicol.....80
Tabela 2 – Média ± desvio-padrão da viabilidade celular de fibroblastos submetidos a diferentes concentrações do EEP.....82
Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) da viabilidade celular entre as diferentes concentrações do EEP, em função das soluções e tempo.....83
Tabela 4 – Teste de Tukey para comparações múltiplas entre os distintos tempos das soluções com propilenoglicol.....84
Tabela 5 – Valores significantes no teste de Tukey na comparação múltipla entre as soluções com propilenoglicol.....86
Tabela 6 – Valores significantes no teste de Tukey na comparação múltipla entre as soluções sem propilenoglicol.....88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Preparação do EEP: em A) filtragem do EEP; em B) Resíduo sólido (cera) obtido após filtração.....62
Figura 2 – Remoção do solvente em rotaevaporador.....62
Figura 3 – Representação esquemática da extração em etanol e partição líquido-líquido da própolis.....63
Figura 4 – Cromatografia de coluna de sílica gel da fração hexânica do EEP.....64
Figura 5 – Representação esquemática do fracionamento da fração hexânica do EEP.....65
Figura 6 – Placas cromatográficas das frações da fração hexânica da própolis (frações 8-20 e 36-47).....65
Figura 7 – Representação esquemática do fracionamento da fração acetato de etila do EEP.....66
Figura 8 – Pellet formado após centrifugação.....68
Figura 9 – Representação esquemática de subcultivo, para realização dos testes de curto e longo prazo.....69
Figura 10 – Câmara de Neubauer para contagem de células.....70
Figura 11 – Células mortas, coradas pelo azul de Trypan (seta). Células viáveis, não coradas.....70
Figura 12 – Soluções-estoque e porcentagem dos componentes.....71
Figura 13 – Esterilização das soluções-estoque com filtro Milipore (0,22µm).....72
Figura 14 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico com propilenoglicol (veículo 1 – Placa X), no teste a curto prazo.....73
Figura 15 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol (veículo 2 – Placa Y), no teste a curto prazo.....73
Figura 16 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico com propilenoglicol (veículo 1 – Placa X), no teste a longo prazo.....74
Figura 17 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol (veículo 2 – Placa Y), no teste a curto prazo.....74
Figura 18 – Placa de cultura (96 poços) acondicionada em estufa de cultivo.....75
Figura 19 – Placa contendo células FLM, após colocação do revelador resazurin 10%....76

Figura 20 – Monocromador UVM – 340 (Asys) para leitura de absorvância.....77
Figura 21 – Substâncias identificadas pelas análises de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C nas fases hexânica e acetato de etila do EEP.....79
Figura 22 – Gráfico de colunas ilustrando a porcentagem da sobrevivência de fibroblastos nas soluções testadas a curto prazo.....81
Figura 23 – Gráfico de linhas ilustrando a viabilidade celular das soluções de própolis e veículos com propilenoglicol (Placa X) nos diferentes períodos experimentais.....85
Figura 24 – Gráfico de colunas ilustrando a proporção da média da viabilidade celular no teste a longo prazo, nas soluções com propilenoglicol (Placa X).....87
Figura 25 – Gráfico de linhas ilustrando a viabilidade celular das soluções de própolis e veículos sem propilenoglicol (Placa Y) nos diferentes períodos experimentais.....89
Figura 26 – Gráfico de colunas ilustrando a proporção da média da viabilidade celular no teste a longo prazo, nas soluções sem propilenoglicol (Placa Y).....90
Figura 27 – Estudos sobre as propriedades da própolis.....91
Figura 28 – Estudos sobre os métodos utilizados para análise da composição química da própolis.....92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
CAPE	Éster fenil ácido cafeico
CC	Cromatografia em coluna
CCDAE	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CG	Cromatografia Gasosa
CG – EM	Cromatografia Gasosa associada à Espectometria de Massa
$CHCl_3$	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO_2	Dióxido de Carbono
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Di-metil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
EUA	Estados Unidos da América
FLM	Fibroblastos de mucosa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ISO	Organização Internacional de Padronização
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólio
O_2	Oxigênio
P	Própolis
PA	Pró-análise
PBSA-1	Solução tampão fosfato-salina
PG	Propilenoglicol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Rpm	Rotações por minuto
SBF	Soro Bovino Fetal

UAR	Úlcera aftosa recorrente
V	Veículo hidroalcoólico
V/PG	Veículo hidroalcoólico com propilenoglicol

LISTA DE SÍMBOLOS

ºC	graus Celsius
%	porcentagem
mg/mL	miligrama por mililitro
µg/mL	micrograma por mililitro
µg	micrograma
µM	micromolar
mL	mililitro
µL/mL	microlitro por mililitro
mg/Kg	miligrama por kilograma
º	graus
mg	miligrama
g/Kg	grama por kilograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 Composição química da própolis.....21
2.2 Atividades antimicrobianas.....26
2.3 Atividades anticarcinogênica e antimutagênica.....32
2.4 Atividades antiinflamatória e cicatrizante.....39
2.5 Efeitos tóxicos e alergias.....48
2.6 Cultura celular.....51
2.7 Testes de citotoxicidade.....53
3 OBJETIVOS.....59
4 MATERIAIS E MÉTODOS 60
4.1 Amostra de própolis.....60
4.2 Amostra de células 60
4.3 Resazurin ou Alamar Blue.....61
4.4 Preparação do extrato etanólico de própolis.....61
4.5 Análise química da própolis.....62
4.5.1 Fracionamento da fração hexânica do EEP.....64
4.5.2 Fracionamento da fração acetato de etila do EEP.....65
4.6 Preparo da cultura de células.....67
4.7 Subcultivo, passagem ou replicação.....68
4.8 Determinação do número de células presentes em cada frasco.....69
4.9 Preparo das soluções-estoque de própolis.....70
4.10 Soluções experimentais.....72
4.11 Teste de viabilidade celular a curto prazo.....74
4.12 Teste de sobrevivência celular a longo prazo.....76
4.13 Análise Estatística.....78
5 RESULTADOS.....79
5.1 Compostos químicos identificados na própolis.....79
5.2 Viabilidade celular a curto prazo.....80
5.3 Teste de sobrevivência celular a longo prazo.....81

6 DISCUSSÃO.....91
7 CONCLUSÕES.....101
REFERÊNCIAS.....102
APÊNDICES.....119
ANEXOS.....140

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais têm sido utilizados pela medicina popular em todo o mundo por milhares de anos, principalmente devido à suas propriedades farmacológicas. Dentre eles, a própolis é reconhecida atualmente como um produto muito útil, tanto na medicina humana quanto na veterinária (ÖZAN *et al.*, 2007).

Trata-se de uma substância resinosa, de aroma característico, cuja cor varia entre amarelada, esverdeada clara, vermelha e marrom escuro, dependendo de sua origem botânica e idade. É coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, em diferentes locais das plantas, tais como brotos, botões florais e exsudatos resinosos. Essa resina é transportada até a colméia, processada e em sua composição são adicionadas substâncias secretadas do seu metabolismo como a cera e enzimas salivares (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995; BÚFALO *et al.*, 2009).

Tem um cheiro característico, agradável ao olfato, com consistência terrosa ou pegajosa, dependendo também de sua origem vegetal e idade (AZEVEDO *et al.*, 1986; BANSKOTA *et al.*, 1998; BANSKOTA *et al.*, 2000). As abelhas a utilizam na colméia para vedar frestas e orifícios; diminuir a abertura da entrada e saída, impedindo a presença de inimigos e promovendo isolamento térmico; mumificação de cadáver de invasores e revestimento dos favos de mel, esterilizando o ambiente interno contra microrganismos para postura dos ovos (AZEVEDO *et al.*, 1986; KUJUMGIEV *et al.*, 1999).

Fisicamente, a própolis é dura e quebradiça quando fria e maleável e muito pegajosa quando quente. Seu ponto de fusão é variável entre 60-70ºC podendo atingir, em alguns casos, até 100ºC (MARCUCCI, 1996).

A composição química da própolis é muito complexa; os componentes ativos mais importantes são os ácidos aromáticos, compostos fenólicos e flavonóides (BURDOCK, 1998; OZKUL *et al*., 2005), além de esteróides, óleos essenciais, ésteres de ácidos graxos, aminoácidos, pigmentos vegetais e vitaminas B1 e B2 (MOREIRA, 1986). Porém, esses constituintes e atividade farmacológica podem variar amplamente de região para região, e as aplicações da própolis em várias áreas têm levado a um maior interesse na sua composição química e na sua origem (PARK *et al*., 2002).

Recentemente, tem ganhado popularidade em bebidas saudáveis e também tem sido extensivamente usada em comidas em várias partes do mundo, incluindo Japão, Brasil, Estados Unidos da América (EUA) e Europa, onde é utilizada com o intuito de promover saúde e prevenir doenças, tais como doenças do coração, diabetes e até mesmo câncer (BANSKOTA *et al*., 1998; BANSKOTA *et al.*, 2000; AKAO *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004).

Tem sido usada amplamente na medicina popular e na indústria biocosmética devido às suas propriedades antisséptica, antimicótica, bacteriostática, adstringente, espasmolítica, antiinflamatória e anestésica (BURDOCK, 1998; GIUSTI *et al.*, 2004; SIMÕES *et al.*, 2008). É comercialmente encontrada na forma de tabletes, loções, sprays, ungüentos, soluções, cápsulas, cremes, dentifrícios e goma de mascar (BURDOCK, 1998; GIUSTI *et al.*, 2004).

O interesse de investigadores por conhecer melhor a utilidade da própolis tem aumentado, e por esse motivo, pesquisas em distintas partes do mundo vêm sendo realizadas e resultados satisfatórios têm sido encontrados no tratamento de pacientes com úlcera por decúbito, úlcera na mucosa bucal, gengivites e úlceras crônicas gastrointestinais (LEVYA; MESA, 2007).

O principal problema da própolis, como outros produtos originários das abelhas (mel, geléia real e cera), é a notável diversidade da sua composição química, que varia de acordo com a flora, condições sazonais, tempo da coleta e presença de contaminantes. Também existe a dificuldade de definir qual o tipo de própolis é mais indicada para o uso medicinal, devido à variabilidade na qualidade da mesma (MARCUCCI, 1996; ÖZAN *et al.*, 2007).

Alguns autores salientaram que não existe uma padronização quanto à concentração de própolis empregada, seus veículos e suas indicações na distribuição comercial. Fica evidente, portanto, a sua prática empírica, tanto pelos profissionais quanto pela população (MAGRO-FILHO; PERRI DE CARVALHO, 1990; SILVA *et al.*, 2000).

De acordo com Pereira *et al.* (2002), o interesse global de pesquisas com a própolis tem duas justificativas: uma devido a suas características de panacéia, a qual atrapalha sua aceitação por médicos e outros profissionais que tendem a desconfiar de sua eficácia, pois dezenas de atividades biológicas simultâneas são atribuídas à mesma; outra, é seu alto valor agregado, principalmente nas exportações. Porém, apesar da posição de destaque na produção e comércio da

própolis, a atividade de pesquisa no Brasil não reflete em número, nem em conteúdo, o interesse internacional que a própolis brasileira possui, principalmente para os japoneses.

Além da dificuldade para a padronização da própolis, o delineamento experimental ainda é incompleto posto que pesquisadores utilizam diferentes concentrações de própolis *in vitro* e *in vivo*, bem como diferentes extratos, períodos e rota de administração (SFORCIN, 2007).

Há muita discussão a respeito da exata concentração de própolis que diferentes produtos deverão ter, uma vez que não existe uma regulamentação para a porcentagem máxima da mesma. A legislação brasileira regulamenta o uso da própolis nos cosméticos, mas não nos medicamentos, indicando a concentração de 2,5% como limite máximo, e não proíbe o uso destinado às crianças. Na área odontológica, vem sendo auto-prescrita para o tratamento de lesões bucais sem, no entanto, obedecer a uma forma sistematizada de uso e sem o conhecimento prévio mais aprofundado sobre as indicações e o mecanismo de ação sobre os sistemas biológicos (SANTOS, 1999).

As exigências internacionais para a qualidade dos produtos apícolas obrigam os países a estabelecer normas para definir padrões mínimos de comercialização, especialmente para própolis. É necessário informações precisas a respeito da composição química dos vários tipos de própolis produzidas no Brasil e sua relação com as atividades terapêuticas para as quais deverão ser comercializadas. Países como China, Austrália, Argentina e Uruguai possuem redes nacionais de laboratórios para o controle de qualidade química e biológica de suas amostras apícolas, o qual garante o seu espaço e longevidade no comércio exterior. Nesse contexto, é necessário que o Brasil implemente esse sistema, visando maior competitividade no mercado mundial (PAULINO, 2005).

De acordo com Hanks *et al*. (1996) e Martins *et al.* (2009), o teste de citotoxicidade *in vitro* para avaliar a toxicidade de produtos é o sistema biológico, no qual células entram em contato com as substâncias a serem estudadas. É o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material, e só depois de comprovada a não toxicidade é que pesquisas com animais e humanos devem ser executadas. O uso de cultura celular para testar a biocompatibilidade de materiais usados na Odontologia está ganhando importância, visto que esses podem ter efeitos citotóxicos em células dos locais onde são empregados (ARENHOLT-

BINDSLEV; BLEEG, 1990; VAN WYK *et al*., 2001). Porém, observa-se que muitas pesquisas são realizadas com o intuito de conhecer as ações da própolis em diferentes especialidades odontológicas, com eficácia comprovada. Contudo, poucos estudos foram realizados com o propósito de testar a citotoxidade da mesma.

O estudo da toxicidade de um material deve ser realizado em três etapas: primeiro, a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, que em saúde representa o sistema biológico em que os produtos entram em contato direto com culturas celulares, com o objetivo de analisar o comportamento celular em meio controlado, livre das complexas interações do organismo. As vantagens dessa metodologia são, além do controle ambiental das células, a facilidade e a rapidez de sua execução e baixo custo. Após essa análise preliminar, devem-se realizar experimentos em animais para, em seguida, serem aplicados clinicamente em humanos (MARTINS *et al*., 2009).

Uma vez que os fibroblastos são células muito importantes na regeneração dos tecidos, e como na cavidade bucal essas células estão presentes em todas as mucosas (jugal, gengival, ligamento periodontal e polpa dental), todas as substâncias utilizadas na Odontologia, inclusive a própolis, devem ser biocompatíveis com essas células, não as lesionando e se possível, estimulando a sua proliferação. Entretanto, não há estudos que avaliem a citotoxicidade da própolis, especialmente a oriunda do estado de Mato Grosso do Sul. Assim sendo, torna-se relevante este ensaio *in vitro* sobre a ação da própolis sobre fibroblastos de mucosa jugal humana, que permitirá analisar seu efeito citotóxico, viabilidade e estímulo à proliferação celular, em diferentes concentrações.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Composição química da própolis

Como a própolis é uma mistura de várias substâncias, a mesma não é facilmente extraída ou fracionada. Para determinar a sua composição química, torna-se necessário o fracionamento simples da amostra. O método usual para extrair é a fração solúvel em álcool, denominada fração resinosa. Nesse processo, obtém-se também a fração insolúvel em álcool, formando a fração cerosa. Bálsamo de própolis refere-se à fração que pode ser extraída com álcool 70% (GHISALBERTI, 1979).

São muitos os componentes químicos isolados da própolis. Em geral, é composta por 50 a 60% de resinas e bálsamos vegetais, 30 a 40% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B_1, B_2, B_6, C e E (AZEVEDO *et al.*, 1986).

Moreira (1986) avaliou a composição química de 4 amostras de própolis provenientes do estado de Minas Gerais e 6 amostras adquiridas no comércio de São Paulo (Brasil). A fração solúvel em éter de petróleo, um dos métodos de extração, apresentou esteróides, pigmentos vegetais, óleos essenciais, ésteres de ácidos graxos e álcoois de cadeia longa. As vitaminas encontradas foram B_1 e B_2, porém, a vitamina C não foi evidenciada. Diversos aminoácidos também estavam presentes nas amostras.

De acordo com Marcucci (1995), são conhecidas na própolis, diversas substâncias de estruturas químicas distintas, pertencentes às classes álcoois, aldeídos, ácidos alifáticos, ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonóides, ésteres hidrocarboidratos, éter, ácidos graxos, cetonas, terpenóides, esteróides e açúcares.

Park *et al*. (1997) analisaram os flavonóides de 46 amostras de própolis coletadas pelas abelhas *Apis mellifera*, das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Os resultados demonstraram que a qualidade e a quantidade de flavonóides agliconas foram similares nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, porém, esses foram

muito diferentes da região Sul. Os flavonóides quercetina, canferol, apigenina e sacuranetina foram encontrados em todas as regiões. Na região Sul, foram encontradas altas concentrações de crisina e galangina e, na região Sudeste, foram identificados 9 flavonóides agliconas. Concluiu-se que a diferença na composição da própolis foi devido, provavelmente, à diversidade ecológica. Os autores também observaram que todas as amostras de extratos etanólicos provocaram inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo, porém, *Escherichia coli* não foi inibida.

Bankova *et al.* (1998) pesquisaram a composição química da própolis brasileira coletada por duas subespécies de abelhas *Apis mellifera L.* (africanizadas e européias) nas 4 estações do ano. A análise química por Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa associada à Espectometria de Massa (CG-EM) indicaram compostos semelhantes. Os principais constituintes encontrados foram compostos fenólicos, especialmente derivados de ácido cinâmico, porém, no outono, os diterpenos foram os majoritários na própolis produzida pelas abelhas européias. Os autores concluíram que ambas as subespécies de abelhas coletaram as própolis do mesmo grupo de plantas e que existiram pelo menos duas importantes plantas de origem, na qual sugeriram ser espécies Baccharis e Araucária.

Na análise química da própolis por CG-EM, Kujumgiev *et al.* (1999) encontraram que nas amostras da zona temperada (Europa e Mongólia), ésteres de ácidos fenólicos e flavonóides predominaram, enquanto que nas amostras provenientes da região tropical (Brasil), pequena ou nenhuma quantidade desses compostos foram encontrados. Nessa região, os constituintes majoritários foram compostos aromáticos e ácidos diterpênicos. Apesar da grande diferença na composição química, as atividades antimicrobianas das amostras brasileiras foram semelhantes àquelas das européias.

É marcante a diferença da composição química observada entre própolis das regiões tropical e temperada. As originadas nas zonas temperadas (Oeste da Ásia, Europa e Norte da América) possuem uma composição química similar, sendo que os principais constituintes são compostos fenólicos, como flavonóides, ácidos cinâmicos e derivados. Nessas regiões, exsudatos de diferentes brotos de p*opulus ssp.*, representam a principal origem, juntamente com outras árvores (*Betula alba, Fagus sylvatica, Aesculus hippocastanum, Alnus glutinosa*). Nas regiões tropicais,

como não existem plantas *populus ssp.*, as abelhas utilizam outras plantas para a produção da própolis (BANSKOTA *et al.*, 2000).

Paredes-Guzmán *et al.* (2003) realizaram uma pesquisa com o objetivo de identificar a substância Artepillin C (ácido 3,5 – diprenil – 4 – hidroxicinâmico), em várias amostras de própolis procedentes de diferentes regiões sul-americanas. A análise química foi por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) fase reversa, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Foram investigadas própolis brasileira coletada no estado do Paraná e nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Sul de Minas Gerais. A origem da própolis do Paraná, mostrou ser *Baccharis caprariaefolia* (Alecrim pluma), a qual mostrou perfis químicos similares à respectiva própolis e também Artepillin C. Nos outros estados, a origem da própolis foi *Baccharis dracunculifolia* e também foi encontrado Artepillin C.

O perfil químico da própolis originada de plantas poplar (*populus ssp.*), típico da zona temperada, foi padronizado por Bankova (2005) através da caracterização de três parâmetros: conteúdo de flavonas e flavonóis totais, conteúdo de flavanonas e diidroflavonóis e fenólicos totais. De acordo com o pesquisador, esses parâmetros correlacionam melhor com a atividade biológica e são mais informativos que a quantificação dos compostos individuais. A utilização de materiais padronizados permitiria associar um tipo de própolis particular a um tipo de atividade biológica específica e formular recomendações para profissionais que trabalham nessa linha de pesquisa, garantindo sua qualidade, segurança e eficácia e, principalmente, para ser aceita oficialmente nos tratamentos de saúde em geral.

A análise por CG-EM da própolis originária da Turquia, por Ozkul *et al.* (2005), apresentou principalmente flavonóides (17,3%), ácido fático (25,4%), ácidos aromáticos (6,3%), ésteres aromáticos (5,7%) e cetonas (16,8%).

Funari e Ferro, em 2006, realizaram análise espectrofotométrica de 3 amostras de própolis brasileira para determinação dos teores de flavonóides e fenóis totais. O valor encontrado de flavonóides foi 2,64%, expressos como equivalentes de quercetina di-hidratada; o teor de fenóis totais foi 7,39%. Os autores também identificaram por CLAE, ácido clorogênico, cafeico, para-cumárico, ferúlico, trans-cinâmico e artepillin C, além dos flavonóides isosacuranetina e canferida, tanto na própolis quanto na planta que lhe deu origem (*Baccharis drancunculifolia*).

Mani *et al.* (2006) analisaram a amostra de própolis proveniente do Sudeste do Brasil por CG-EM, revelando que seus principais componentes foram compostos fenólicos (flavonóides, ácidos aromáticos e benzopiranos), di e triterpenos e óleos essenciais. De acordo com os autores, os flavonóides geralmente estão presentes em pequenas quantidades na própolis brasileira, o que sugere que suas várias atividades podem ser devido a seus diferentes constituintes, que variam de acordo com a estação e a origem vegetal disponível na região geográfica onde a própolis foi produzida.

A composição química de uma amostra de própolis coletada no estado do Ceará, onde a vegetação predominante é a caatinga, foi pesquisada por Albuquerque *et al.* (2007). Do extrato etanólico de própolis (EEP) foram isolados e caracterizados por RMN, os triperpenos lupeol, lupenona e germanicona e os flavonóides quercetina, canferol e acacetina.

Segundo Lemos *et al.* (2007), a *Baccharis dracunculifolia*, uma planta nativa do Brasil, comumente conhecida como Alecrim-do-campo ou Vassourinha, é a origem botânica mais importante da própolis do Sudeste do país, a qual é conhecida como própolis verde devido à sua cor. A análise por CLAE revelou que os principais constituintes químicos do extrato da planta foram flavonóides e derivados de ácido cinâmico.

Longhini *et al.* (2007) avaliaram o teor de flavonóides totais da própolis do Brasil extraída a partir de etanol e propilenoglicol. Os pesquisadores afirmaram que os extratos glicólicos não são recomendados como eficientes para o processo de extração dos constituintes da própolis, devido ao baixo teor de flavonóides obtidos quando comparados aos extratos etanólicos. Esse fato pode ser explicado por ser a própolis um material resinoso, insolúvel em água. Os glicóis melhoram a extração das substâncias flavonoídicas em relação à água pura, mas não em comparação ao álcool e suas diluições, quando o material a ser extraído é uma resina. Em sua pesquisa, o uso de diferentes concentrações de propilenoglicol tornou-se necessário em comparação ao extrato alcoólico, pois os glicólicos são de grande utilização no mercado farmacêutico, por serem menos agressivos à pele e mucosas, quando comparados ao álcool e propiciarem formas farmacêuticas emulsionadas mais estáveis.

A CLAE, realizada por Funari *et al.* (2007), identificou os principais constituintes da própolis originária do Sudeste do Brasil como sendo Artepillin C,

ácido para-cumárico, ácido ferúlico, ácido trans-cinâmico, ácido clorogênico, ácido cafeico, canferol, canferida e isosacuranetina. No total, 2,64% foram flavonóides e 7,39% compostos fenólicos.

A análise química de 4 amostras de própolis originária da Turquia e uma do Brasil, realizada por Koru *et al*. (2007) por meio da CG-EM, demonstrou como principais constituintes: flavonóides (pinobanksina, quercetina, naringenina, galangina e crisina) e ácidos aromáticos (ácido cafeico). As amostras analisadas apresentaram diferentes solubilidades em etanol; esse fato foi evidente até mesmo na tentativa de dissolução da mesma quantidade da amostra de própolis no mesmo volume de etanol. Para os autores, quanto maior o conteúdo de compostos hidrofílicos na amostra, mais alta é a solubilidade da amostra, ou seja, a presença de constituintes flavonóides favoreceria a solubilidade. No estudo, a amostra brasileira demonstrou a menor quantidade de flavonóides e, consequentemente, demonstrou ter a menor solubilidade em etanol.

Em Cuba, Cuesta-Rubio *et al.* (2007) coletaram 65 amostras de própolis de 11 províncias, com o objetivo de estudá-las quimicamente. Utilizando 3 diferentes técnicas, os autores classificaram-nas em 3 tipos principais, diretamente relacionados com as classes de metabólitos secundários, em própolis marrom, vermelha e amarela. Em relação aos constituintes principais, a marrom mostrou ser rica em benzofenóis, a vermelha em isoflavonóides e a amarela em compostos alifáticos. Os pesquisadores criaram um sistema de classificação que caracterizou 85% das amostras estudadas, demonstrando a validade e aplicabilidade da pesquisa.

Os constituintes da própolis variam de acordo com o método de extração. Mais notavelmente, a própolis obtida pela extração aquosa contém aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos, os quais não estão presentes na extração etanólica. A extração aquosa é amplamente usada como aditivos em comidas e cosméticos, devido a suas propriedades e por causar mínima estimulação olfatória. Por outro lado, a extração com etanol fornece facilmente compostos lipofílicos, que estão em grandes quantidades, o qual atrai considerável interesse por parte dos pesquisadores (INOUE *et al.*, 2008).

Búfalo *et al.* (2009), por meio da CCDAE e CG-EM, revelaram que os componentes principais exibidos em uma amostra de própolis verde brasileira foram

os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos aromáticos, benzopiranos), di e triterpenos e óleos essenciais.

2.2 Atividades antimicrobianas

Ikeno *et al.* (1991) pesquisaram o efeito da própolis procedente de diferentes regiões (China e Japão), em cáries dentais e seu efeito inibitório no crescimento bacteriano de *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus cricetus*, além da síntese de glucanos insolúveis e atividade da glicosiltransferase. Os experimentos *in vitro* demonstraram atividade antimicrobiana contra todas as espécies testadas. Nos experimentos com animais inoculados com *S. sobrinus*, o consumo de 1mg/mL de própolis na água levou a uma inibição de cárie entre 56,2 e 62,2% comparados ao grupo controle. O estudo também mostrou inibição da atividade da glicosiltransferase, enzima que intervém no metabolismo da sacarose e na redução da síntese de glucanos insolúveis, o qual influencia na formação e adesão do biofilme.

Amoros *et al.* (1992) observaram a atividade antiviral *in vitro* do extrato de própolis e dos principais flavonóides identificados na própolis originária da França, contra vírus herpes simples do tipo I. Foram testados flavonóides isolados e o efeito sinérgico binário de flavonóis (galangina, canferol e quercetina), flavonas (crisina, apigenina, luteolina e tectocrisina) e flavanonas (pinocembrina e isosacuranetina). Os flavonóis foram mais ativos do que flavonas, sendo que a ordem decrescente de maior atividade foi galangina > canferol > quercetina. Ácido cafeico e ferúlico e os flavanonas mostraram pouca ou nenhuma atividade. As diferentes combinações dos flavonóides, principalmente flavonas-flavonóis foram mais efetivas do que os compostos individuais. O extrato de própolis apresentou um dos melhores resultados. Concluiu-se a partir do estudo que a própolis e/ou a associação de seus compostos foram mais ativos do que os compostos isolados na atividade antiviral.

A atividade antimicrobiana de 4 extratos comerciais de própolis e dos seus respectivos solventes (etanol 60%, glicerina, propilenoglicol e óleo de cereais) foi pesquisada por Tosi *et al.*, em 1996 . As soluções de própolis a 30% foram testadas contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*), Gram-

negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*) e fungos (*Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisae*). Os resultados indicaram que todos os solventes isolados foram inefetivos como agentes antimicrobianos, o qual transfere essa propriedade à própolis, visto que os extratos mostraram-se eficazes. Os extratos com etanol, propilenoglicol e óleo apresentaram uma boa inibição dos microrganismos por mais de 2 semanas, variando a eficácia de acordo com o solvente e o microrganismo, enquanto que a solução com glicerina manteve a inibição por apenas 2 a 3 dias. Concluiu-se que o solvente empregado para a extração influenciou na atividade antimicrobiana da própolis.

Kujumgiev *et al.* (1999) relataram os resultados da atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de amostras de própolis de diferentes locais da Europa e Brasil. Todas as amostras foram efetivas contra os fungos (*Candida albicans*) e bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*), e a maioria delas mostraram atividade antiviral (*Avian Influenza*). Porém, nenhuma foi ativa contra a espécie Gram-negativa *Escherichia coli*. Os autores concluíram que apesar das características químicas diferentes, todas apresentaram atividades similares, o que demonstra o valor farmacológico geral da própolis como uma mistura natural e não como uma fonte de novos compostos individuais com poder isolado. Em diferentes compostos, diferentes combinações de substâncias são essenciais para a atividade biológica da própolis.

Setenta e sete cepas de diferentes microrganismos de 200 controles bacteriológicos radiculares foram isoladas por Martorell *et al.* (1999), dos quais 93,5% correspondiam à *Streptococcus viridans, Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus sp*. A sensibilidade e a resistência dos mesmos a uma solução hidroalcoólica de própolis 4% foram testadas e os resultados foram comparados à pesquisa simultânea com cloranfenicol. A pesquisa revelou que 62% dos *Streptococcus viridans* e 85% dos *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus* apresentaram sensibilidade à solução de própolis. O cloranfenicol apresentou resultados superiores apenas contra *Streptococcus viridans*. Conclui-se também que o álcool 70% foi um veículo apropriado, visto que não influenciou na atividade antimicrobiana da solução de própolis.

A redução de estreptococos do grupo mutans em pacientes com atividade de cárie, foi estudada por Zárate-Pereira (1999) por meio da comparação da ação de uma solução de própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% e do fluoreto de

sódio 0,05% isolado (controle). Foram selecionados 2 grupos, com 15 crianças cada, portadores de cárie ativa e foram ministrados bochechos durante 15 dias, onde se observou que os níveis de estreptococos salivares diminuiu em cerca de 66,9% no grupo tratado com própolis, o quê não foi observado no grupo controle.

Abreu *et al.* (2000) selecionaram, aleatoriamente, 50 alunos entre 7 e 10 anos, com antecedentes de alta infecção por *Streptococcus mutans*, para verificar a atividade anticárie de um creme dental contendo própolis. Dois grupos foram formados, um controle, o qual foi submetido a um creme dental placebo e o grupo experimental. Entre ambos, não havia diferença significativa entre o índice de cárie e porcentagem de infectados. Após 18 meses de tratamento, os resultados obtidos mostraram que no grupo tratado com própolis houve redução de 85,6% no número de infectados, quando comparados ao grupo controle, e 72,7% no índice de cárie. Dessa forma, os autores concluíram que a solução de própolis apresentou ação antimicrobiana e anticariogênica.

Em 2000, Koo *et al.* avaliaram, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da própolis sobre 15 patógenos bucais, em especial, a inibição da aderência do *Streptococcus mutans* e formação de glucanos insolúveis em água, e compararam aos resultados do extrato de *Arnica montana*, uma planta herbácea. O extrato etanólico da própolis originária do estado de Minas Gerais (Brasil) inibiu significantemente todos os microrganismos testados, principalmente o *Actynomices viscosus*. A aderência celular e formação de glucanos foram completamente inibidos numa concentração final de 400µg/mL e 500µg/mL, respectivamente, enquanto que o extrato de *Arnica* foi fracamente ativo. Os resultados sugeriram que a própolis contém compostos bioativos que poderiam prevenir as cáries dentárias e doenças periodontais, uma vez que demonstrou significante atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados e, especialmente, inibição da formação da placa dental *in vitro*.

A partir de doze amostras de própolis provenientes de diferentes regiões do Brasil (grupos 1 a 5 – região Sul; grupos 6 a 11 – região Nordeste e grupo 12 - região Sudeste), Park *et al.* (2000b) realizaram testes de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Sobre os *Staphylococcus aureus*, a própolis do grupo 1 não inibiu o crescimento; as dos grupos 2, 9, 10 e 11 inibiram fracamente; as dos grupos 3, 4, 5, 8 e 12 inibiram moderadamente, enquanto que a própolis dos grupos 6 e 7 inibiram fortemente o crescimento dessa bactéria. Com relação aos *S. mutans*, os resultados também variaram dependendo

do tipo de própolis testada. As própolis dos grupos 1, 9, 10 e 11 praticamente não possuíram atividade contra as espécies testadas. Concluíram que a atividade da própolis variou, sendo que algumas agiram de forma mais acentuada em um microrganismo do que em outro.

Paracoccidioidomicose é a mais importante micose sistêmica na América Latina, tendo como agente etiológico o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Diante desse fato, Murad *et al*. (2002) estudaram o efeito de várias concentrações de própolis (5, 10 e 20µg/poço) na atividade de macrófagos contra esse fungo e compararam os efeitos da própolis do Brasil com os produzidos pela própolis da Bulgária, utilizando o mesmo teste. O ensaio *in vitro* mostrou que a própolis aumentou a atividade fungicida dos macrófagos, porém, não significativa ($p<0,05$) quando comparado com células controle. Segundo os autores, essa atividade pode ser devido a um aumento na liberação de substâncias fungicidas pelos macrófagos, tais como metabólitos oxigenados e nitrogenados, além da indução da produção de algumas citocinas. As amostras testadas exibiram efeitos similares.

Ao avaliar a ação da própolis 5% associada ao fluoreto de sódio 0,05% no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental (estudo *in situ*), Zárate-Pereira (2003) verificou atuação eficaz sobre a placa bacteriana supragengival, agindo de maneira significativa na população de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e total de bactérias viáveis. Observou também redução da perda mineral do esmalte submetido a desafio cariogênico, mostrado pelo ensaio de microdureza.

Sonmez *et al.* (2005) pesquisaram o efeito antimicrobiano de 6 soluções de própolis de 4 origens geográficas diferentes (Turquia - própolis 10% em veículo alcoólico e propilenoglicol (PG); Alemanha - própolis 10% veículo alcoólico e PG; Austrália - própolis 30% veículo não alcoólico; EUA - própolis 20% veículo não alcoólico) sobre microrganismos patogênicos orais e os efeitos citotóxicos em fibroblastos gengivais humanos. Foram realizados testes experimentais de todas as amostras em várias diluições (1/64 a 1/8000) contra bactérias anaeróbias, fungos e análise da viabilidade celular. Os resultados demonstraram que na diluição 1/128, todas as amostras foram altamente eficazes contra todos os microrganismos testados, porém, citotóxicas aos fibroblastos. Na diluição 1/256 a 1/512 da própolis alcoólica e PG – Turquia e Alemanha e na diluição 1/1024 a 1/2048 da própolis – Austrália e EUA, mostraram ser concentrações seguras às células, efetivas contra os

fungos, porém, com menor atividade antibacteriana. Concluíram que a própolis, por suas propriedades antimicrobianas, pode constituir uma alternativa para combater os patógenos testados, desde que sejam encontradas concentrações eficazes, que apresentem efeito antibacteriano e que não causem citotoxicidade às células teciduais.

O efeito do extrato etanólico de própolis 30%, originária da Bulgária, em 94 linhagens anaeróbias clínicas, foi avaliado por Boyanova *et al*. (2006). Entre as espécies envolvidas no estudo estavam *Bacteróides fragilis, Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium, Clostridium, Propionibacterium* e *Actinomyces.* O extrato de própolis foi amplamente ativo contra as bactérias anaeróbias, inibindo mais de 89% de todas as espécies em ambos os testes, o qual comprova sua ação antibacteriana. Segundo os autores, os resultados encontrados poderiam motivar um maior interesse médico no uso da própolis para profilaxia ou tratamento de infecções anaeróbias orais, de pele e respiratórias.

Koru *et al*. (2007) analisaram o desempenho antimicrobiano de cinco amostras de própolis (4 provenientes da Turquia e 1 do Brasil) contra nove espécies de bactérias anaeróbias oral (*Pepstreptococcus anaerobius* e *micros, Prevotella oralis* e *melaninogenica, Porphyromonas gingivalis, Fusobacterium nucleatum, Veilonella parvula, Lactobacillus acidophilus e Actinomyces naeslundii)*. Todas as bactérias foram susceptíveis aos extratos etanólicos e a concentração inibitória mínima variou de 4 a 512µg/mL, sendo que as amostras da Turquia foram mais efetivas, o que poderia ser explicado pela diversidade da composição química, a qual depende da região onde a própolis foi coletada. As bactérias anaeróbias Gram-positivas foram mais sensíveis que as Gram-negativas. Os autores concluíram a atividade antimicrobiana de diferentes amostras de própolis e sugeriram que novas pesquisas sejam realizadas para verificar se uma dose suficiente para matar os microrganismos poderiam ser alcançados dentro da cavidade oral, sem causar efeitos adversos local ou sistêmico.

A eficiência do processo extrativo da própolis, variando a concentração da mesma, usando diversos líquidos extratores, foi investigada por Longhini *et al*. (2007). Além disso, examinaram a atividade antifúngica *in vitro* contra 67 leveduras isoladas de onicomicose, uma infecção fúngica ungueal. Os resultados obtidos mostraram que a própolis apresentou atividade antifúngica mesmo em concentrações muito baixas (0,04mg/mL). Essa atividade foi proporcional à sua

concentração, sendo que o EEP 30% foi o mais eficiente, inibindo todas as leveduras e o extrato hidroglicólico 30% foi efetivo apenas quando muito concentrado. Os autores concluíram que a maior efetividade antifúngica esteve ligada aos extratos que apresentaram maior teor de flavonóides totais.

Najafi *et al.* (2007) pesquisaram a ação antibacteriana do extrato aquoso e etanólico de própolis do Irã. Os resultados mostraram que os extratos apresentaram a mesma eficácia ao inibir a crescimento de duas bactérias: *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus.* Os autores concluíram que a própolis possui atividade antibacteriana e que o solvente utilizado (água e etanol) não afetou tal propriedade.

Os efeitos sobre microrganismos orais e fibroblastos gengivais humanos de 4 soluções contendo própolis foram comparadas à enxaguatórios bucais contendo clorexidina 0,2%, por Özan *et al.* (2007). As 4 amostras de própolis foram preparadas em várias concentrações (1,0; 2,5; 5,0 e 10,0%) e em todas, os solventes utilizados foram etanol 70% (25%), propilenoglicol (10%) e água. Em relação à atividade antimicrobiana, a solução de clorexidina foi mais efetiva do que as soluções de própolis, porém, dessas, a concentração a 10,0% apresentou melhores resultados. Quanto ao efeito citotóxico nos fibroblastos gengivais, utilizando teste de difusão em ágar, a solução de própolis 10,0% mostrou leve citotoxicidade e a clorexidina moderada. Concluiu-se que a administração de própolis em concentrações apropriadas pode ser efetiva em microrganismos orais e não citotóxica aos fibroblastos gengivais.

Santos *et al.* (2008) testaram a eficácia clínica de uma formulação de gel contendo solução etanólica de própolis 10%, solução de polisorbato 20 (0,15%) e propilenoglicol 38% em pacientes diagnosticados com candidose bucal. Participaram do estudo 30 pacientes, nos quais 50% foram tratados com Daktarin® (gel miconazol) e 50% receberam a formulação com própolis brasileira. Após avaliação e classificação da severidade das lesões, todos os pacientes receberam as mesmas instruções de higienização e orientações sobre a aplicação dos produtos (4 vezes por dia). Concluiu-se que o gel contendo própolis poderia ser uma escolha tópica alternativa para o tratamento de candidoses, visto que ambos os produtos demonstraram eficácia, com completa remissão do edema do palato e eritema após 1 semana de aplicação. Nenhuma irritação foi relatada, evitando também resistência dos fungos ao antifúngico.

Parma Neto, em 2008, pesquisou *in vitro*, a capacidade do extrato de própolis quanto à inibição de bactérias periodontopatogênicas em forma planctônica e em biofilmes, além de comparar 3 tipos de própolis (vermelha, verde e resinosa) oriundas do Estado de Mato Grosso do Sul. As amostras foram testadas frente às cepas de bactérias anaeróbias facultativas - *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguinis* e *Escherichia coli*, além de cepas clínicas de bactérias periodontopatogênicas, *Aggregatibacter actinomycetencomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Para os ensaios de biofilmes, foram utilizadas culturas mistas provenientes de bolsas periodontais de pacientes com periodontite severa. A partir dos resultados, o autor concluiu que a própolis verde foi ativa contra os periodontopatógenos nas concentrações de 1,6µg/mL, e contra biofilmes 4,0µg/mL.

Em 2008, a ação antimicrobiana da própolis frente aos microrganismos presentes na saliva total e estimulada de humanos, foi pesquisada por Simões *et al.* Avaliou-se, *in vitro*, a ação em três concentrações (11%, 20% e 30%) do extrato de própolis e comparou-se aos produtos industrializados Periogard, Listerine, Malvatricin e Paradontax. Os resultados indicaram que os extratos de própolis, bem como os produtos industrializados, inibiram o consumo de glicose pelos patógenos bucais, confirmando a ação antimicrobiana. As diferentes concentrações testadas não revelaram diferenças estatisticamente significante, concluindo que todas apresentaram a mesma eficácia.

2.3 Atividades anticarcinogênica e antimutagênica

Grunberger *et al.* (1988) demonstraram a atividade antitumoral do éster fenil ácido cafeico (CAPE), um composto presente na própolis, ao apresentar atividades citotóxicas *in vitro* em diferentes linhagens de células de câncer (carcinoma de ovário em hamster, sarcoma em camundongo, carcinoma de mama, cólon, rim e melanoma em humanos). Um resultado bastante interessante da pesquisa foi a ação maior em células modificadas pela oncogênese quando comparadas às células normais. A exposição das células normais a 8µg/mL de CAPE isolado da própolis, 75% das mesmas permaneceram inafetadas, enquanto que nas células cancerígenas, a mesma concentração do composto provocou 90% de morte celular.

A propriedade antitumoral de isômeros diterpenóides, constituintes químicos isolados da própolis brasileira originária dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, foi investigada por Matsuno *et al*. (1997). O teste de citotoxicidade desses compostos em células de carcinoma hepático e pulmonar humanos obteve como resultado o retardo no crescimento das células tumorais, sendo que o tempo necessário para a morte celular foi inversamente proporcional à dose aplicada.

Banskota *et al*. (1998), ao estudarem a própolis do Brasil, identificaram 23 constituintes químicos. Suas investigações sugeriram que a origem da própolis brasileira tropical foram principalmente *Baccharis ssp*., em adição a *Clusia minor, Clusia major* e *Araucaria heterophylla*. Todos os compostos isolados foram testados para avaliar a citotoxicidade em células humanas de fibrossarcoma (HT-1080) e células de carcinoma de cólon (26-L5). Apenas 4 compostos (coniferil aldeído, betuletol, canferide, ermanin) apresentaram potente citotoxicidade, em valores menor ou igual a 10µg/mL. As outras substâncias apresentaram de leve a moderada atividade citotóxica, porém, em concentrações muito elevadas. Segundo os autores, esses resultados indicaram que a atividade anticancerígena da própolis brasileira é atribuída, primariamente, aos compostos fenólicos.

A partir de um extrato metanólico de própolis brasileira, Banskota *et al*. (2000) isolaram dois novos compostos químicos, os quais demonstraram ser derivados de benzofuranos e pesquisaram a citotoxicidade dos mesmos em células de carcinoma de cólon (26-L5) e células de fibrossarcoma humano (HT-1080). Os resultados demonstraram que os compostos apresentaram fraca citotoxicidade nas células testadas. Os autores também encontraram que o extrato metanólico causou ação citotóxica muito maior quando comparado aos compostos isolados, porém sugeriram que esses poderiam ter contribuído para a atividade citotóxica do extrato.

Em 2000a, Park *et al.* coletaram 400 amostras de própolis de *Apis mellifera* em todo o território brasileiro e classificaram-nas em 12 grupos por meio da análise química. Em todos os grupos foram realizados testes para determinar a atividade citotóxica contra diversas linhagens de células cancerígenas e anti-HIV (vírus da Imunodeficiência Humana). Os EEPs inibiram o crescimento das células cancerígenas em uma porcentagem que variou de 14 a 97%. As amostras dos grupos 1 e 2 (região Sul) e, 6 e 7 (região Nordeste) apresentaram alta atividade sobre as células de carcinoma nasofaringeal (KB); as dos grupos 6 e 7 também apresentaram elevada atividade sobre os adenocarcinomas ileocecal (HCT-8),

carcinoma renal (CAKI-1) e adenocarcinoma de mama (MCF-7). Quanto à atividade anti-HIV, apenas os grupos 1 e 5 (região Sul) mostraram atividade contra o vírus. Verificou-se, portanto, atividades antitumoral e anti-HIV de algumas amostras de própolis do Brasil. Segundo os autores, esses resultados demonstraram a diversidade química, que está diretamente associada à localização geográfica e o tipo de vegetação de onde a própolis foi coletada, influenciando em sua atividade biológica.

O drupanin e baccharin, derivados do ácido cinâmico, e presentes na própolis, mostraram atividade inibitória, *in vitro*, em linhagens de células de câncer de estômago (HL60), cólon (SW480) e leucemia (Akao *et al.*, 2003). O estudo mostrou que os compostos testados exibiram atividade antitumoral, porém, esta só foi possível ao utilizarem doses maiores que 30µM, e que o efeito foi devido à apoptose das células tumorais.

Extratos de própolis provenientes de várias regiões de Taiwan foram estudados por Chen *et al*. (2004), em relação a níveis fenólicos, atividade antioxidante e efeitos citotóxicos em células de melanoma humano. Os autores encontraram elevados níveis de conteúdo fenólico e elevada atividade antioxidante, a qual foi maior nos grupos com taxas mais altas de compostos fenólicos. A atividade citotóxica com várias concentrações dos extratos (1,25 a 40µg/mL) mostrou diminuição da viabilidade celular, porém, de maneira dose-dependente. O tratamento das células do melanoma com própolis induziu mudanças na morfologia das células provocadas pela apoptose das mesmas. O trabalho demonstrou efeito antioxidante e anticarcinogênico dose-dependente.

O efeito citotóxico do CAPE e seus derivados, substâncias encontradas na própolis, foram testadas em células cancerígenas orais e células normais por Lee *et al*. (2005). No experimento, foram utilizados 14 compostos em células de carcinoma escamoso de língua humana (SAS), carcinoma epidermóide de gengiva (OEC-M1) e fibroblastos orais humanos normais de gengiva (NHOF) em várias concentrações (0-200µM). O efeito inibitório foi avaliado pelo teste colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólio) e pelo teste de exclusão do azul de Trypan. O CAPE e alguns de seus derivados mostraram efeitos citotóxicos em células SAS e OEC-M1 nas doses acima de 50µM, dose-dependente. As células normais (NHOF) não foram afetadas até a dose de 100µM, porém, doses superiores causaram crescente morte celular. Ambos os testes, apesar de afetar alvos celulares

diferentes, forneceram resultados similares. Os pesquisadores sugeriram que esses compostos podem ser úteis em tratamentos quimioterápicos de câncer bucal.

Orsolic *et al*. (2005a) pesquisaram o efeito de dois extratos aquosos de própolis, provenientes da Croácia e do Brasil, e de compostos polifenólicos isolados das mesmas, no desenvolvimento do tumor ascite de Ehrlich. Doses de 50mg/kg foram administradas em camundongos e 2 horas após, o tumor foi induzido por meio da injeção intraperitoneal de células tumorais (2×10^6). Os resultados revelaram que todos os compostos testados inibiram o crescimento tumoral e proliferação das células, porém, os extratos obtiveram melhores índices do que os compostos isolados. Em relação à resposta imunomodulatória, observou-se aumento na quantidade de células polimorfonucleares e diminuição das mononucleares (macrófagos). Apesar do menor número de macrófagos, os compostos testados afetaram o estado funcional dos mesmos, aumentando sua atividade tumoricida. Os autores concluíram o efeito sinérgico dos componentes presentes na própolis em sua atividade antitumoral, visto que os extratos foram mais efetivos do que os compostos isolados. Observaram também que a atividade dos macrófagos pode ter sido a responsável pelo menor crescimento das células tumorais.

Dois extratos aquosos de própolis, provenientes da Croácia e do Brasil, e dois compostos fenólicos isolados das mesmas (ácido cafeico e CAPE) foram testados, *in vivo* e *in vitro*, na atividade citotóxica em células tumorais (HeLa) (Orsolic *et al*, 2005b). Para determinar o efeito direto no crescimento do tumor, foram aplicadas injeções subcutâneas na perna de camundongos, contendo 10^5 células tumorais viáveis e imediatamente após, foram injetados no mesmo local, os compostos (50 ou 150mg/kg) descritos acima. Os compostos fenólicos inibiram o crescimento tumoral e aumentaram a sobrevivência dos animais tratados, de modo dose-dependente, ou seja, maiores doses exibiram maior potencial antitumoral, enquanto os extratos aquosos foram menos efetivos. Os autores concluíram que a atividade antitumoral dos extratos aquosos não foi o resultado da citotoxicidade direta nas células tumorais, enquanto os compostos polifenólicos presentes na própolis afetaram o crescimento tumoral por meio da inibição da síntese de DNA e exerceram efeito antitumoral direto pelo contato íntimo com as células tumorais.

Um micronúcleo é um núcleo extra, pequeno, separado de um principal e gerado durante a divisão celular, através de cromossomos recentes ou através de fragmentos de cromossomo e, está associado a eventos precoces de carcinogênese

(Ozkul *et al*., 2005). Diante desse fato, os autores investigaram o potencial anticarcinogênico *in vitro* da própolis (concentrações 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 0,70 e 1,00mL em 6mL de meio de cultura) em linfócitos humanos, por meio da avaliação da taxa de micronúcleos e índice mitótico em cultura de linfócitos periféricos, obtidos de pacientes saudáveis. Os resultados demonstraram que o aumento da concentração de própolis aumentou a taxa de micronúcleo (a concentração de 1mL foi 3 vezes maior do que o controle) e diminuiu o índice mitótico. Os autores concluíram que o índice mitótico indicou que a própolis é um agente anticarcinogênico, porém, o teste de micronúcleo mostrou que altas concentrações podem torná-la carcinogênica, o que sugere que a mesma seja utilizada com precaução em estudos *in vivo*.

Li *et al*. (2007) avaliaram o efeito do extrato etanólico de uma própolis proveniente do Sul do Brasil e uma do Sudeste do Brasil, além do broto da origem botânica desta última, *Baccharis dracunculifolia*, na proliferação de células do câncer de próstata humana derivadas do tumor primário e proveniente de metástases. Como resultado obtiveram que as 3 amostras testadas, nas concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; e 20,0µg/mL, inibiram o crescimento das linhagens celulares testadas, porém, a eficácia foi melhor nas células metastáticas. Concluíram que a própolis da região Sul apresentou maior inibição de crescimento e que todas apresentaram efeito anticarcinogênico.

Ao realizarem experimentos com o extrato aquoso de própolis, EEP e alguns compostos polifenólicos (ácido cafeico, naringina, crisina, quercetina) isolados da própolis, Orsolic *et al*. (2006) concluíram que a própolis e seus constituintes poderiam ser potenciais candidatos em terapias de tratamento do câncer. Todas as substâncias foram testadas em várias concentrações (50, 150 e 300µg/mL) em células de carcinoma transicional de bexiga humana e em células epiteliais normais do órgão. O teste de citotoxicidade *in vitro* demonstrou um resultado tempo e dose dependentes, nas células do carcinoma e nenhuma toxicidade foi encontrada nas células epiteliais, nas concentrações testadas. Comparando-se a eficácia da atividade citotóxica, os melhores resultados foram vistos nos carcinomas bem diferenciados, enquanto que a efetividade nos carcinomas moderadamente e pobremente diferenciados foi similar. Em relação ao agente mais efetivo, o EEP exibiu melhores resultados, demonstrando a ação sinérgica dos diferentes

compostos presentes no extrato, quando comparados aos compostos isolados ou ao extrato aquoso.

Devido aos poucos estudos relativos ao mecanismo de ação da própolis, Tavares *et al.* (2006) estudaram o efeito mutagênico e antimutagênico da mesma em células de ovário de hamster chineses. Diversas concentrações do EEP originária do Brasil (12,5; 25,0; 50,0 e 100,0µL/mL), bem como o extrato adicionado à Doxorubicin (quimioterápico), nas concentrações de 12,5; 25,0 e 50,0µL/mL e Doxorubicin isolado, foram testados *in vitro* em cultura celular, e a freqüência de aberrações cromossômicas e índices mitóticos foram avaliados. Os resultados demonstraram que a concentração de 100µL/mL do extrato de própolis apresentou efeito mutagênico nas células, porém, menores concentrações promoveram um efeito protetor contra o dano induzido pelo Doxorubicin. Concluiu-se que altas doses de extratos de própolis podem ser genotóxicos, e que a mesma deve ser usada com precaução. Os autores sugeriram que os flavonóides podem ser os componentes da própolis responsáveis por ambos os efeitos mutagênico e antimutagênico, uma vez que esses compostos podem agir ou como pró-oxidante ou como removedor de radicais livres, dependo da concentração utilizada.

Najafi *et al*. (2007) pesquisaram o grau de inibição ou estimulação de um extrato aquoso de própolis originária do Iran, em diferentes tipos celulares. O extrato nas concentrações de 1 e 2mg/mL inibiram o crescimento de algumas linhagens celulares testadas: McCoy, HeLa, SP2/0, HEp-2 e BHK21. No caso de células normais usadas no experimento (linfócitos humanos, células do rim, fígado e baço de ratos) resultaram que as mesmas concentrações estimularam o crescimento e a proliferação das mesmas, sendo que na concentração de 2mg/mL, a viabilidade foi superior. Concluiu-se que o extrato aquoso de própolis teve a capacidade de agir como inibidor de crescimento para algumas linhagens celulares cancerígenas e estimulador de crescimento para células normais. Os autores sugeriram que a própolis contendo diferentes compostos químicos, especialmente ácidos fenólicos e flavonóides, foram capazes de controlar o crescimento celular e distinguir células normais de células do câncer.

Quarenta e três compostos químicos foram isolados da própolis vermelha brasileira originária do estado da Paraíba por Awale *et al*. (2008). A principal planta de origem mostrou ser a do gênero Dalbergia e os compostos isolados demonstraram ser principalmente flavonóides. O extrato metanólico da própolis

avaliada mostrou 100% de atividade citotóxica contra linhagem de células de câncer pancreática humana (PANC-1) na concentração de 10µg/mL. A análise das células mortas mostrou mudanças morfológicas do tipo necróticas, porém, não causou fragmentação do DNA.

Díaz-Carballo *et al*. (2008) isolaram um flavonóide presente na própolis originária do Caribe, denominado mucronulatol, que também é encontrado em uma ampla variedade de espécies de plantas. O estudo demonstrou que o composto isolado exerceu citotoxicidade em várias linhagens de células cancerígenas humanas (LAN-1- neuroblastoma; MCF-7- adenocarcinoma de mama e HCT8 – adenocarcinoma de cólon) resistentes à quimioterapia. Os autores concluíram que o mecanismo de ação envolveu interferência da substância no controle da progressão do ciclo celular.

Diversos ensaios, *in vivo* e *in vitro*, foram realizados por Inoue *et al*. (2008), com o objetivo de observar o efeito antitumoral de um extrato aquoso de própolis em células de sarcoma (S-180). Nos testes *in vitro*, várias concentrações do extrato foram testadas (0,5 a 128,0µg/mL) encontrando efeito inibitório na síntese do DNA dose-dependente, sendo que a menor concentração eficaz foi 1,0µg/mL e na concentração de 50,0µg/mL, houve 90% de inibição. Nos experimentos *in vivo*, os autores, após realizarem transplantes de células tumorais em camundongos e administração oral do extrato nas concentrações 320mg/kg e 960mg/kg, obtiveram como resultado, retardo no crescimento tumoral de maneira dose-dependente. O exame histológico revelou redução da atividade mitótica das células e supressão da infiltração no tecido muscular.

Li *et al.* (2008) avaliaram a atividade citotóxica *in vitro* de 42 compostos químicos (39 flavonóides e 3 lignanas), isolados da própolis vermelha coletada no estado de Paraíba (Brasil), contra 6 diferentes linhagens celulares de câncer (humana- A549, HeLa, T-1080; animais - 26-L5, B16-BL6, HT-1080). Os resultados mostraram que todos os constituintes testados exibiram diferentes potenciais de atividade citotóxica, porém, o 7-hidroxi-metoxiflavanone mostrou a maior atividade contra todas as linhagens testadas. Concluíram que a citotoxicidade dos compostos avaliados exerceu atividade de modo dose-dependente, embora esse efeito tenha variado entre os tipos celulares. Sugeriram que o 7-hidroxi-metoxiflavanone e mucronulatol são bons candidatos para o desenvolvimento de futuras drogas anticâncer.

O efeito mutagênico da própolis verde brasileira foi constatado por Pereira *et al*. (2008). Testes de genotoxicidade *in vivo* foram realizados, e o potencial mutagênico em células periféricas do sangue de camundongo, por meio da administração de dose única de 0,5mL do extrato aquoso nas concentrações de 1000, 1500 e 2000mg/kg foram avaliados. Os resultados evidenciaram que, nas concentrações pesquisadas, a própolis causou dano ao DNA das células do sangue (leucócitos, eritrócitos) analisadas.

Búfalo *et al.* (2009) investigaram a ação citotóxica, *in vitro,* do extrato etanólico de própolis verde brasileira em células de carcinoma epidermóide laríngeo humano (Hep-2). Foram testadas várias concentrações do extrato (5, 10, 25, 50 e 100µg/poço da cultura celular) e somente o veículo (etanol) nas mesmas concentrações que eles estavam presentes nos extratos testados. A observação da viabilidade celular e morfologia foi realizada após 6, 24, 48 e 72 horas da aplicação dos produtos. Os resultados indicaram que a própolis exibiu efeito citotóxico de modo tempo e dose dependente, ou seja, altas concentrações mostraram ação em curto tempo, enquanto que concentrações menores foram efetivas com o passar do tempo. O veículo alcoólico não alterou nem a morfologia, nem a quantidade de células viáveis, sugerindo que a citotoxicidade foi exclusivamente devido aos compostos químicos presentes na própolis.

2.4 Atividades antiinflamatória e cicatrizante

Azevedo *et al.* (1986) testaram o uso da própolis, na concentração de 3%, no tratamento de escaras de decúbito. O estudo verificou vantagens significativas na evolução da lesão com o tratamento, observando maior rapidez na regeneração da área da ferida, principalmente ao considerar o baixo custo do produto em relação aos medicamentos habitualmente utilizados, apresentando uma alternativa viável para o tratamento dessas ulcerações.

Um produto contendo própolis 50%, propilenoglicol, colóide flexível e álcool 95° foi elaborado por Silveira *et al.* (1988) e testado em 20 pacientes que apresentavam gengivite crônica, e 20 portadores de úlceras aftosas recorrentes inespecíficas. Nos casos de gengivite, o produto foi aplicado 3 vezes por semana,

em dias alternados, durante 1 mês, resultando em uma recuperação mais rápida e melhor dos tecidos gengivais, quando comparado ao grupo controle (aplicação de álcool etílico 95º), com 70% de cura clínica. Nas úlceras aftosas com evolução de 24 a 48 horas, a medicação foi aplicada topicamente, permanecendo de 2 a 3 minutos sobre as mesmas em campo seco. Os pacientes retornaram após 24 horas, apresentando diminuição da dor, com avançada recuperação, sendo que em poucos casos, foi necessária uma segunda aplicação. As lesões do grupo controle demoraram de 4 a 6 dias para desaparecer os sintomas. Os autores puderam comprovar os efeitos antimicrobianos, cicatrizantes, anestésico e de aumento da resposta imune local com aplicação da formulação elaborada.

Magro Filho e Perri de Carvalho (1990) examinaram, histologicamente, os efeitos da própolis na cicatrização de alvéolos após extração dentária e em feridas de pele (uso local), em 45 ratos. Para o experimento, utilizaram solução hidroalcoólica de própolis a 10% e solução hidroalcoólica pura, aplicadas no alvéolo, imediatamente após a extração, e sobre a ferida, diariamente, até o período de sacrifício dos animais (3, 6, 9, 15 e 21 dias de tratamento). O estudo demonstrou que a solução de própolis acelerou a epitelização das feridas cutâneas, porém, não provocou nenhuma alteração marcante no alvéolo, embora uma influência favorável tenha sido notada durante o período pós-operatório inicial. Os grupos tratados com a solução hidroalcoólica apresentaram um atraso em ambas feridas testadas.

Com o objetivo de avaliar as propriedades cicatrizantes da própolis, Mendoza *et al.* (1991) testaram um creme contendo essa resina a 2% em úlceras vasculares de membros inferiores. Para o estudo, 30 pacientes que apresentavam lesões com duração média de 1,5 anos, foram submetidos à aplicação do produto por até 8 semanas. Em 36% dos casos, as úlceras cicatrizaram em 6 semanas e 60% demoraram 8 semanas para atingir esse resultado. Na análise do tamanho, as lesões foram classificadas em varicosas (30%) e pós-flebíticas (70%), tendo como resultado 100% de redução das primeiras e 60% nas segundas. Os microrganismos presentes nas lesões foram detectados como sendo estafilococos, proteus e pseudomonas. Após o tratamento, apenas em 2 casos as úlceras se mantiveram assépticas. Os autores concluíram que a própolis apresentou excelente atividade cicatrizante, porém, não demonstrou boas propriedades antimicrobianas, a qual poderia estar associada à baixa concentração utilizada.

A efetividade antibiótica, antiinflamatória, cicatrizante e de aumento da resposta imune local da própolis foi constatada por Quintana Díaz (1992), ao utilizá-la no tratamento de alveolites após extração dentária. Para o experimento, 2 grupos de 20 pacientes com a afecção foram selecionados, no qual um grupo utilizou propolina 8% e no outro (controle), foi aplicado Alvogyl, que representa um produto frequentemente utilizado em Cuba. Os resultados foram similares em ambos os grupos, em que a maioria obteve cura nas primeiras 72 horas de tratamento. Porém, os autores concluíram que a propolina mostrou efetividade ligeiramente superior, visto que apenas 2 pacientes demoraram mais de 72 horas para a cura, enquanto que no controle, 4 pacientes apresentaram a mesma situação.

Silveira *et al.* (1992) realizaram um estudo com o objetivo de conhecer a efetividade de uma solução hidroalcoólica de própolis cubana 1,5%, em gengivites crônicas. Um grupo de 20 estudantes de 16 anos de idade foram selecionadas e separadas em 2 grupos. O grupo A realizou bochechos noturnos com solução de própolis, 1 vez/dia durante 3 minutos, por 15 dias consecutivos, e o grupo B realizou o mesmo procedimento com a solução placebo. Antes do tratamento, 70% do grupo A apresentava gengivite moderada e 30% grave, enquanto no grupo B, 10% apresentava gengivite leve, 70% moderada e 20% grave. Após o tratamento, a gengivite crônica regressou quase à normalidade no grupo tratado com própolis (80%), porém, 80% das estudantes do grupo placebo permaneceram com gengivite moderada (50%) e grave (30%). Os autores concluíram a efetividade da solução de própolis na cura e prevenção da gengivite crônica e sua importância na manutenção da saúde periodontal.

Com o intuito de avaliar a efetividade de uma tintura de própolis 10% em álcool 70º e comparar aos efeitos produzidos pelo medicamento Periodontone (França) que possui propriedades antiinflamatória, antibiótica e bacteriostática, Cabarrocas e Gómez (1994) realizaram uma pesquisa com 60 pacientes portadores de úlceras aftosas recorrentes. Um total de 80 úlceras foram tratadas com própolis e 76 com Periodontone, os quais foram aplicados nas lesões e deixadas secar sobre as mesmas durante 3 a 4 minutos. A avaliação da dor e da epitelização clínica foi realizada todos os dias durante 1 semana, e as aplicações foram repetidas diariamente, segundo a evolução das úlceras. Os resultados foram muito satisfatórios no grupo da própolis, visto que a dor cessou na quase totalidade das lesões após 24 horas (92,5%) e 48 horas (98,7%), e ao 3º dia mais de 90% das

feridas haviam epitelizado (ausência de tecido conjuntivo exposto). Os resultados obtidos pelo Periodontone foram significativamente inferiores ($p < 0,01$) aos obtidos pela própolis. Neste estudo, comprovou-se a eficácia da própolis no tratamento de úlceras na mucosa bucal.

Magro Filho e Perri de Carvalho (1994) analisaram os efeitos tópicos de uma solução hidroalcoólica de própolis no reparo de feridas cirúrgicas, após realização de sulcoplastias pela técnica de Kazanjian. O estudo foi realizado com 3 grupos de nove pacientes, no qual o grupo C1 não recebeu tratamento, o C2 utilizou enxaguatório bucal contendo apenas solução hidroalcoólica 5% e o grupo T realizou bochechos contendo a solução hidralcoólica de própolis 5%. Os experimentos foram realizados 5 vezes/dia durante 1 semana. A avaliação clínica e citológica após a cirurgia foi executada nos dias 7, 14, 30 e 45. Os autores verificaram que os enxaguatórios bucais contendo própolis auxiliaram no reparo das feridas cirúrgicas, e promoveram um efeito antiinflamatório e analgésico. A epitelização das feridas cirúrgicas foi verificada pela citologia esfoliativa.

Os efeitos hemostático, antiinflamatório, cicatrizante, anestésico e de aumento da resposta imune local foram confirmados por Quintana Díaz (1996), ao realizar experimentos *in vivo*, cuja metodologia baseava-se na aplicação de duas soluções de própolis (1 em veículo alcoólico – “propolina”, e 1 em propilenoglicol – “propodal”) em tratamentos cirúrgicos (apicectomia, extrações múltiplas, dentes retidos, epúlide fissurada, alveoloplastias e extrações simples) e no tratamento de úlceras bucais. Os autores observaram que irrigações com soluções de própolis ocasionaram diminuição do sangramento no trans-operatório, redução do edema e da dor e melhor cicatrização no pós-operatório, quando comparados ao grupo controle que não recebeu nenhum tratamento. Com relação às úlceras, foram realizadas aplicações tópicas, onde foram observados em 100% dos casos, diminuição dos sintomas dolorosos 24 e 48 horas após a primeira aplicação. Os resultados foram excelentes se comparados ao grupo controle tratado com bálsamo de Shostakovski, no qual a dor começou a ceder depois de 4 a 6 dias de aplicação do produto.

Dez pacientes que apresentavam feridas faciais (6 provenientes de brigas ou acidentes de trânsito, 3 exérese de carcinoma basocelular e 1 otoplastia) com secreções, eritema e exame microbiológico apresentando microrganismos Gram-positivo (90%) e Gram-negativo (10%), foram submetidos a um tratamento com

extrato alcoólico de própolis 5% (QUÍNTANA DÍAZ *et al.*, 1997). O tratamento foi por meio de aplicações tópicas diárias do extrato, sem prescrição de antibioticoterapia oral ou parenteral. Após 7 dias de tratamento, 90% dos pacientes haviam se curado das feridas, enquanto que o paciente infectado por microrganismos Gram-negativos demorou 13 dias para atingir a cura total. Os pesquisadores comprovaram o efeito antibacteriano e cicatrizante no tratamento de feridas sépticas faciais.

Silva *et al.* (2000) realizaram um estudo histológico do efeito da ação da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos. Foram induzidas lesões com exposição do tecido conjuntivo na mucosa bucal, realizadas com o auxílio de uma broca esférica e tratamentos diários de 6 em 6 horas foram executados utilizando solução alcoólica de própolis 10 e 30% e solução alcoólica 96º (controle) durante 3, 5, 10 e 14 dias. Os resultados mostraram que a solução de própolis 10% apresentou uma resposta mais eficiente do que a de 30%, visto que aos cinco dias de tratamento com a solução a 10%, as células epiteliais eram nucleadas e bem organizadas, apresentando estratificação celular, enquanto a solução a 30% retardou o reparo tecidual, promovendo alterações na velocidade de cicatrização da ferida. Os autores concluíram que a própolis, em dosagens corretas, não provocou reação inflamatória e induziu a formação epitelial, bem como neoformação vascular e fibroblástica do tecido conjuntivo subjacente. Estaria, então, indicada para o tratamento e reparação das feridas abertas por segunda intenção em mucosa bucal.

Em 2001, um caso de úlcera eosinofílica em uma criança de 13 meses de idade tratada com própolis foi relatado por Kiderman *et al*. Duas lesões ulceradas localizadas na mucosa palatina, em cada lado da rafe palatina mediana, permaneceram inalteradas (tamanho e aparência) durante 4 meses, apesar de várias tentativas de tratamento. Diante desse quadro, a aplicação local de um ungüento, cuja formulação apresentava 1 parte de própolis para 2 partes de lanolina, foi prescrita por um médico. Foram feitas aplicações tópicas durante dez dias, onde observou-se diminuição do tamanho e da profundidade das lesões, com desaparecimento completo em vinte dias. Não foi constatado recorrência em 20 meses de acompanhamento. Os autores concluíram que a própolis foi eficaz na cura desse tipo de úlcera de etiologia desconhecida.

Quintana Díaz *et al.* (2003) elaboraram um creme contendo própolis (5% própolis, 80% vaselina e 15% lanolina) e aplicaram em 414 pacientes apresentando diversas feridas, entre as quais 76,3% corresponderam à feridas cirúrgicas, 13,1%

fraturas nasais, 6,2% úlceras bucais e 4,4% queilite actínica nos lábios. Os pacientes foram tratados durante 3 dias (24, 48 e 72 horas) e avaliados após 7 e 15 dias de aplicado o produto. Após 1 semana, nos casos de úlceras bucais e queilite actínica, houve cicatrização completa das lesões e a maioria cedeu a dor nas primeiras 72 horas. Os autores encontraram excelente resultado em 100% dos casos, constatando melhora na cicatrização e diminuição na dor. Não foi constatada nenhuma reação adversa.

A influência do mel e da própolis, na cicatrização por segunda intenção de feridas induzidas cirurgicamente, foram avaliadas por Rahal *et al*. (2003). Após execução das lesões (incluía pele, tecido subcutâneo e músculo tronco-cutâneo) na região torácica lateral esquerda de 60 ratos, os mesmos foram submetidos a aplicações tópicas diárias de mel (1/3 animais), própolis – Propaste, Apifarma (1/3 animais) e solução fisiológica 0,9% - controle. As feridas foram avaliadas histologicamente e mensuradas com paquímetro nos dias 3, 7, 14 e 21. Os resultados demonstraram que os tratamentos com mel ou própolis proporcionaram uma resposta inflamatória de menor intensidade ao longo do tempo, quando comparados ao controle, porém, a própolis levou a uma reepitelização mais precoce. As medidas das áreas das feridas não diferiram estatisticamente entre os grupos. Os autores concluíram que os tratamentos com mel e própolis conduziram a uma melhor cicatrização pela redução da resposta inflamatória.

Grégio *et al.* (2005) avaliaram histologicamente a ação cicatrizante do EEP 30% sobre úlceras induzidas em mucosa oral de ratos. Os autores, após constatação clínica da formação da lesão ulcerada, trataram a mesma por meio de aplicações tópicas diárias e a análise histopatológica foi realizada após 2, 7, 14, 21 e 42 dias de tratamento. Foi evidenciado diminuição do tempo de epitelização da úlcera e qualidade e quantidade de células presentes no infiltrado inflamatório de tecido conjuntivo quando comparado ao grupo controle, que foi submetido à aplicação tópica de soro fisiológico. Os resultados permitiram concluir que a própolis exerceu uma aceleração dos fenômenos relacionados à cicatrização, o qual poderia favorecer o processo de reparo de lesões ulceradas utilizando formulações que contenham a própolis como princípio ativo.

Com o objetivo de avaliar o efeito terapêutico da própolis em úlceras aftosas recorrentes (UAR) tipo minor, Lotufo *et al.* (2005) realizaram um estudo longitudinal com 40 pacientes saudáveis que apresentavam história de UAR e que já haviam se

submetidos a terapias severas anteriormente, porém, sem resultados satisfatórios. Os pacientes foram divididos em 2 grupos: o primeiro incluindo 10 pessoas (25%) com aparecimento das úlceras em um intervalo entre 7 e 21 dias, e o segundo (75%) com recorrência entre 30 e 90 dias. Os pacientes relataram média de 1 a 6 lesões por recorrência, com duração variável de 7 a 21 dias. Assim, foram medicados topicamente com solução de própolis 5% em propilenoglicol (20% etanol, 5% propilenoglicol e água deionizada), 3 vezes ao dia, durante o aparecimento e episódios de recorrência durante 1 ano. Constataram redução no número das lesões, duração e freqüência de recorrência. Os autores concluíram que esse medicamento natural, barato e inócuo (visto que não provocou efeitos colaterais) se mostrou benéfico no tratamento das UARs.

Em 2005, Sabir *et al*. investigaram a resposta da polpa dental de ratos após capeamento pulpar direto com extratos de própolis originária da Indonésia. Foram utilizados 3 grupos de nove ratos, nos quais foram preparados cavidades classe I no primeiro molar do lado direito e exposição das respectivas polpas. No grupo controle (1) foi realizado capeamento com óxido de zinco, e nos outros 2 grupos foi aplicado a própolis. O EEP foi purificado, isolando própolis com flavonóides (grupo 2) e sem flavonóides (grupo 3). Os resultados da análise histológica mostraram que o capeamento do grupo 2 inibiu a resposta inflamatória da polpa dental na primeira semana, porém, na segunda e quarta semana, foi detectada moderada inflamação em 22,2% das polpas. Nesse mesmo grupo, foi observado formação parcial de ponte dentinária na quarta semana. Os grupos 1 e 3 apresentaram respostas inflamatórias em todas as 4 semanas analisadas. Os autores concluíram que os flavonóides contidos na própolis podem diminuir a resposta inflamatória da polpa e estimular a dentinogênese reparativa.

Com o propósito de avaliarem o potencial da ingestão diária de cápsulas de 500mg de própolis na redução do número de recorrências de UARs, Samet *et al.* (2007) promoveram um estudo piloto randomizado, duplo-cego, placebo-controlado em 19 pacientes, por um período de 6 a 13 meses. Concluíram que no grupo da própolis, 60% dos pacientes apresentaram mais de 50% de redução na freqüência de recorrência, enquanto que no grupo placebo, apenas 11% demonstrou o mesmo.

Barros *et al.* (2007) avaliaram a atividade antiúlcera do extrato hidroetanólico da própolis verde oriunda da região Sudeste do Brasil. Para a pesquisa, grupos de ratos foram divididos e submetidos à administração oral com doses de 50, 250 e

500mg/kg do extrato da própolis, omeprazol (30mg/kg) ou cimetidina (100mg/kg) e solução controle. Úlceras gástricas agudas foram induzidas por etanol, antiinflamatório não esteroidal (Indometacin) e por estresse. Os resultados mostraram que houve redução significativa ($p < 0,05$) das lesões induzidas por etanol em todas as concentrações do extrato quando comparado ao controle, porém, nas úlceras induzidas por Indometacin, altas doses do extrato (500mg/kg) foram necessárias para obter esse efeito. Nas úlceras por estresse, em doses acima de 250mg/kg, houve significativa redução das lesões. Concluiu-se que a própolis verde, na concentração acima de 250mg/kg, apresentou boa atividade antiúlcera, contribuindo para sua validação farmacológica.

Em 2007, a atividade antiúlcera da principal origem botânica da própolis verde, a *Bacharis dracunculifolia* foi pesquisada por Lemos *et al.* Os pesquisadores, após administração oral em ratos do extrato nas doses de 50, 250 e 500mg/kg (grupos 3, 4 e 5) e dois medicamentos - omeprazol 30mg/kg ou cimetidina 100mg/kg (grupo 2), induziram 3 tipos de úlceras gástricas utilizando etanol 99,5%, antiinflamatório não esteroidal (Indometacin) e por estresse. Como resultado, obtiveram que todas as concentrações do extrato causaram diminuição significativa ($p < 0,05$) na área total e porcentagem da lesão em todos os 3 tipos de úlceras induzidas, quando comparadas ao controle (grupo 1), principalmente nas lesões induzidas por etanol . A pesquisa também demonstrou diminuição significativa no volume do suco gástrico e na acidez do mesmo. Concluíram que o extrato estudado mostrou atividade gastroprotetora dose-dependente, o qual pode ser atribuído aos compostos químicos presentes, sugerindo seu uso em preparações fitoterápicas para o tratamento de úlceras gástricas.

Levya e Mesa (2007) realizaram um estudo em 226 pacientes com o intuito de avaliar a efetividade da tintura de própolis a 5% no tratamento de UARs. As lesões foram observadas após 24, 48 e 72 horas e após 5 e 7 dias de tratamento. Os resultados mostraram que após 48 horas, 78,8% dos pacientes tratados com própolis apresentaram desaparecimento total da dor e sinal de diminuição do tamanho da lesão; e após 72 horas, 83,7% tiveram alta do tratamento. Concluíram que a aplicação da própolis em UAR foi um método rápido, de baixo custo e de fácil execução com resultados altamente satisfatórios, independentemente da idade e gênero.

A evolução de 22 úlceras crônicas de diferentes etiologias foi avaliada por Santos *et al.* (2007) após terapêutica tópica diária com própolis. Observaram que durante o tratamento, os pacientes referiram melhora da dor e do calor local, diminuição do odor, do inchaço, da secreção e da coceira. A própolis promoveu nessas lesões uma ação bactericida e bacteriostática, confirmada pela manutenção do leito da ferida em condições ótimas para a cicatrização, sendo que essa ocorreu em um tempo médio de 13 semanas.

Após análise prévia da própolis verde oriunda da região Sudeste do Brasil, Barros *et al*. (2008) encontraram como compostos químicos principais, os ácidos fenólicos, tais como: ácidos cafeico, ferúlico, para-cumárico e cinâmico. No intuito de pesquisar as propriedades antiulcerogênicas dos mesmos, úlceras gástricas foram induzidas em animais utilizando drogas antiinflamatórias não-esteroidais, etanol e por estresse. Foram utilizados para o tratamento, doses de 50 a 250mg/mL dos compostos, nos quais observaram significante ($p < 0,05$) diminuição das lesões e porcentagem das mesmas quando comparada ao controle negativo. Concluíram que os ácidos fenólicos estudados possuíram atividade gastroprotetora, como foi evidenciado por sua inibição ao desenvolvimento de úlceras induzidas por agentes físicos e químicos. Os autores também realizaram teste de toxicidade aguda oral, em que obtiveram que a dose tóxica foi maior que 2000mg/kg.

McLennan *et al*. (2008) investigaram o efeito de uma aplicação única de própolis na cura de ferimentos induzidos em animais diabéticos e não diabéticos (controle), comparados a ferimentos tratados com solução fosfato-salina nos mesmos animais. Os autores induziram diabetes em ratos e após seis semanas criaram as lesões na pele dos mesmos. O tratamento com a própolis aumentou a taxa de fechamento da ferida nos animais diabéticos, porém, não mostrou efeitos adicionais nos animais controle. Esses resultados macroscópicos foram confirmados pela avaliação histológica, na qual foi notada reepitelização dos bordos da ferida. Os efeitos da própolis sugeriram que algumas dificuldades de cicatrização presentes em ferimentos nos diabéticos foram atenuados pela própolis. Os autores analisaram o conteúdo de células presentes no tecido da ferida, mostrando normalização na quantidade de neutrófilos e macrófagos com a aplicação da própolis.

2.5 Efeitos tóxicos e alergias

Camps *et al.*, em 2001, avaliaram em coelhos, a irritabilidade dérmica, oftálmica e o efeito sensibilizante de um creme elaborado a partir da própolis. O produto a 15%, aplicado na pele durante 4 dias, mostrou ser não irritante. O creme a 10 e 15% nas estruturas oculares demonstrou ser moderadamente irritante. Nenhum animal (total de 30) demonstrou sensibilização ao contato do produto a 2% com a pele. Os autores concluíram que esse produto cumpriu os requisitos indispensáveis para a sua aceitação a partir de estudos em animais.

Com o objetivo de obter informações sobre a toxicidade oral de uma tintura de própolis em ratos, de ambos os sexos, Pérez Capote *et al*. (2003) administraram, com uma sonda intragástrica, um volume de própolis correspondente à dose de 2g/kg do extrato. Os animais foram observados durante 14 dias, analisando o peso corporal, presença de sinais tóxicos (dispnéia, salivação, temperatura corporal, tremores, etc) e observação macroscópica de órgãos (coração, rins, pulmão, fígado). Os resultados não mostraram alteração em nenhum dos animais. A avaliação da irritabilidade dérmica, após aplicação de 0,5mL do EEP sobre a pele intacta de coelhos, apresentou índice de irritação primário igual a zero. Concluiu-se que a dose administrada não foi tóxica e o produto não foi irritante para a pele dos animais.

Os efeitos da própolis e do hidróxido de cálcio nos fibroblastos da polpa dental e ligamento periodontal foram analisados por Al-Shaher *et al*. (2004), visando testar a citotoxicidade desses materiais, para futuro uso da própolis como medicação intracanal. A análise da viabilidade das células foi realizada pela técnica de manchamento violeta-cristal, seguido da análise em espectofotômetro. A exposição das células da polpa e ligamento periodontal às várias concentrações de própolis (0-20mg/mL) e hidróxido de cálcio (0-250mg/mL), mostrou mínima toxicidade da própolis em células do ligamento periodontal e fibroblastos da polpa em concentrações iguais ou menores que 4mg/mL (viabilidade de mais de 75% das células), enquanto que concentrações semelhantes de hidróxido de cálcio, foram extremamente tóxicas (somente 25% dos fibroblastos permaneceram viáveis). Desse modo, concluíram que a própolis, por suas propriedades antimicrobianas e habilidade para aumentar a resposta imune, poderia ser uma substituta viável como medicação intracanal devido a sua menor citotoxicidade.

Elgezua *et al*. (2004) relataram um caso de dermatite alérgica de contato por própolis, em uma mulher de 21 anos. A paciente referiu tratar com um creme composto por tomilho, própolis e propilenoglicol, um eczema em ambas as bochechas. Após dois dias de aplicação tópica, uma erupção pruriginosa (lesões eritemato-descamativas) surgiu apenas na área de contato de aplicação. Foi realizado tratamento com antibióticos e corticosteróides tópicos, e em poucos dias, foi constatada resolução completa do quadro. Foram realizados testes epicutâneos com propilenoglicol 2% aquoso e própolis 10% em vaselina. Os resultados deram forte positividade às 48 e 96 horas aos produtos com própolis, concluindo o diagnóstico de dermatite por contato à própolis.

Em 2004, 2 casos de alergias de contato à própolis, comprovados por meio de testes específicos, foram relatados por Fernández *et al*. No primeiro caso, foi prescrito solução de própolis 25% para o tratamento de uma ulceração oral recorrente em uma paciente de 64 anos de idade. Após 2 dias de iniciado o bochecho, 2 vezes ao dia, foi evidenciado edema labial progressivo, dor, inchaço, disfonia e dispnéia. Em outra paciente de 65 anos, foram prescritas pastilhas de própolis como um suplemento nutricional e estimulante do sistema imune. Os sinais/sintomas foram dor e inchaço na língua com progressiva disfonéia, 8 horas depois do uso da primeira pastilha. Para ambos os casos, o tratamento realizado foi administração de costicosteróide e anti-histamínico e o desaparecimento dos sintomas foi observado em 3 dias.

Durante oito anos, Giusti *et al*. (2004) investigaram a freqüência de sensibilidade de contato a própolis em 1255 crianças (7 meses a 12 anos de idade) com suspeita de alergia de contato. Os testes de alergia incluíram 30 alérgenos, incluindo própolis 20%. Os resultados demonstraram 5,9% de reposta positiva à própolis, com freqüência significantemente maior em meninos. A dermatite estava localizada principalmente na face, mãos e membros. Um aumento linear significante na freqüência, com o passar dos anos, foi notada (por exemplo: 1995 – 2%; 2002 – 13,7%), refletindo o aumento no uso de produtos naturais em crianças. Os autores sugeriram que a própolis não deveria ser usada em produtos tópicos em crianças devido à alta taxa de sensibilidade em idade pediátrica.

Silva *et al*. (2004) pesquisaram o potencial irritativo da própolis 10%, *Casearia sylvestris*, Otosporin e soro fisiológico (controle) para avaliar a biocompatibilidade desses produtos. Animais receberam injeção do corante azul de Evans 2%, por via

intravenosa, na veia caudal, e em 4 pontos pré-determinados foram injetados intradermicamente 0,1mL das substâncias testes. As análises dos resultados mostraram que a própolis apresentou o menor valor de exsudato inflamatório agudo, ou seja, de todas as substâncias testadas, foi a que apresentou o menor potencial irritativo, podendo representar uma alternativa como medicação intracanal em tratamentos endodônticos. O Otosporin, que é um agente antiinflamatório esteroidal, que inibe a fosfolipase A2, foi o menos efetivo dentre as substâncias.

A função neuroprotetora da própolis verde brasileira foi comprovada por Shimazawa *et al*. (2005) ao realizarem experimentos *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, o extrato aquoso e etanólico de própolis em várias concentrações (4 a 40µg/mL) inibiu a neurotoxicidade em células (PC 12) diferenciadas neuronalmente, pela exposição à peróxido de hidrogênio, por 24 horas ou privação de soro por 48 horas. No teste *in vivo*, a administração intraperitoneal do extrato aquoso de própolis (30 ou 100mg/kg), em camundongos, em 4 momentos (48, 24 e 1 hora antes e 4 horas depois da indução de isquemia cerebral pela oclusão da artéria central do cérebro), reduziu a área de infartamento cerebral. Os autores sugeriram que os resultados encontrados foram devidos, pelo menos parcialmente, às propriedades antioxidantes da própolis.

Um caso de dermatite de contato tardia foi relatado por Brailo *et al*. (2006), em uma paciente de 20 anos, devido ao uso tópico de uma solução contendo própolis 50% (Stomadhesive®, ConvaTec Ltd) utilizada para o tratamento de UAR. A reação alérgica foi comprovada por meio de testes. As lesões manifestaram-se 10 dias após o uso da solução, apresentando erosões irregulares parcialmente cobertas por pseudomembrana nos lábios e mucosa oral, sem sintomatologia sistêmica. Os autores enfatizaram o potencial antigênico da própolis e sugeriram que a mesma deveria ser usada cuidadosamente como agente tópico para o tratamento de doenças orais.

Funari *et al*. (2007) avaliaram a atividade biológica da própolis originária do Sudeste do Brasil em fibroblastos NIH-3T3 de camundongo, por serem células diretamente envolvidas no processo de cicatrização. Ao estudar a origem da própolis, os autores demonstraram ser a *Baccharis dracunculifolia* DC (popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha) sua principal fonte botânica. Quanto à citotoxicidade *in vitro*, diversas concentrações foram analisadas, encontrando que 0,12 a 15,6µg/mL de própolis não resultaram em morte celular

significativa, porém, concentrações superiores a 31,3µg/mL apresentaram elevada citotoxicidade. Os autores ressaltaram que na concentração de 125µg/mL apenas 2% das células permaneceram viáveis, e as respectivas soluções controles não foram tóxicas. Concluiu-se que a própolis estudada exerceu um efeito tóxico em fibroblastos de camundongos, diretamente influenciada pela concentração testada.

2.6 Cultura Celular

A cultura de células de tecidos de animais iniciou-se no século passado, com o trabalho do zoólogo americano Harrison (1907), ao demonstrar que fragmentos de tecido podiam ser mantidos *in vitro*, empregando culturas de medula espinhal embrionária de anfíbios. Foi possível observar o crescimento dos axônios de neuroblastos, e estabelecer que esses se formavam por expansão, a partir do corpo neuronal e não por fusão de uma cadeia de células. As observações do pesquisador resolveram uma das controvérsias em neurobiologia, ao demonstrar que as fibras nervosas efetivamente emergiam das células nervosas do tubo medular (HARRISON, 1907)

De acordo com Freshney (1990), o sistema biológico mais utilizado para testes de toxicidade *in* vitro é a cultura celular, que constitui valioso instrumento para observar a reação celular em relação à diversos materiais. O principal objetivo da técnica de análise da citotoxicidade utilizando o cultivo celular é permitir o estudo do comportamento celular em um meio controlado, livre das complexas interações do organismo. Os testes de culturas celulares podem ser divididos em duas classes: resposta em curto prazo e sobrevivência em longo prazo. Os ensais em curto prazo medem a proporção de células viáveis após serem submetidas a situações traumáticas. A maioria desses testes se baseia no rompimento da integridade da membrana, visualizado pela incorporação de um corante vital ao qual a célula é normalmente impermeável ou na liberação de um isótopo radioativo. Já os testes em longo prazo, determinam a capacidade metabólica ou proliferativa das células após uma determinada influência tóxica. Segundo o autor, o estudo *in vitro* utilizando culturas celulares tem se mostrado preferencial devido à homogeneidade das amostras e à facilidade de uma padronização, pois é possível o controle de fatores,

tais como pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO_2 e O_2. Porém, existem certas dificuldades, como a necessidade de se trabalhar em ambiente estéril e asséptico, o que exige certa prática do pesquisador.

A cultura celular é utilizada em grande escala para o crescimento de vírus, produção de vacinas, desenvolvimento de anticorpos monoclonais, produção de substâncias farmacêuticas, como hormônios, enzimas, fatores de crescimento e coagulação, manipulada por técnicas de DNA recombinante. A técnica de cultura celular contribuiu significativamente na pesquisa do genoma humano e nas vias de sinalização intra e intercelular, que regulam a expressão gênica. Desse modo, é uma tecnologia indispensável nos ramos das ciências biológicas, pois fornece as bases para o estudo da proliferação celular, diferenciação e formação de produtos em condições cuidadosamente controladas (MCDONALD, 1990).

Métodos alternativos em que não se utilizam animais tais como a cultura de células e/ou tecidos, devem ser os de primeira escolha, sempre que possível e apenas os materiais que mostrarem respostas favoráveis é que devem ser utilizados em animais, em uma etapa posterior. Em decorrência disso, os estudos de biocompatibilidade, cuja metodologia é baseada na utilização de culturas celulares, têm se tornado bastante freqüentes (WATTS; PATERSON, 1992; HANKS *et al.*, 1996).

Segundo Kavalco (1999), as culturas primárias são aquelas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, com ou sem um passo inicial de fracionamento das células, podendo ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar culturas secundárias, podendo ser repetidamente subcultivadas dessa forma, por semanas ou meses. Essas células apresentam muitas propriedades diferenciadas apropriadas à sua origem, como por exemplo: fibroblastos continuam a secretar colágeno; células nervosas lançam axônios que são eletricamente excitáveis e fazem sinapse com outra célula nervosa; células epiteliais formam extensivas lâminas com muitas das propriedades de um epitélio intacto. Como esses fenômenos ocorrem em cultura, eles são passíveis de pesquisas que não seriam possíveis de serem estudados *in vivo*.

Tanto as linhagens de células transformadas quanto as de células não transformadas são extremamente úteis nas pesquisas envolvendo culturas celulares, como fonte de grande quantidade de células de um tipo uniforme, especialmente por

poderem ser estocadas em nitrogênio líquido, por um período indefinido e continuarem viáveis, quando descongeladas (KAVALCO, 1999).

Em uma pesquisa realizada por Huang *et al.* (2002) as células de fibroblastos gengivais primários (HGF) foram mais sensíveis do que as células de carcinoma escamoso (OC2) quando do teste de citotoxicidade de adesivos ortodônticos. Os autores constataram a diferença de comportamento biológico das células normais quando comparado às células modificadas.

Os testes com culturas celulares (método *in vitro*) vêm sendo utilizados com sucesso por serem reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente viáveis. Através desses testes é possível estudar *in vitro* a biocompatibilidade e se comparados aos testes *in vivo*, possuem a vantagem de limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente, além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente utilizado em âmbito clínico (ROGERO *et al.*, 2003).

2.7 Testes de citotoxicidade

Muitos testes biológicos, como os de citotoxicidade, necessitam mensurar a sobrevivência e/ou proliferação celular, os quais podem ser realizados por vários métodos, entre eles, a contagem de células que inclui/exclui um corante, avaliação da proteína Cromo (^{51}Cr) depois da lise celular e avaliação da incorporação de nucleotídeos radioativos (^{3}H timidina) durante a proliferação celular. O sal de tetrazólio ou MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólio) pode ser empregado como um método quantitativo colorimétrico para avaliação da sobrevivência e da proliferação de células. Esse método detecta o sinal gerado pela ativação de células vivas, cuja avaliação é realizada por um espectofotômetro, equipamento também chamado de leitor de Elisa, que apresenta um alto grau de precisão na leitura de incrementos celulares para o estudo de citotoxicidade. As vantagens do método colorimétrico são a sua rapidez e precisão (MOSMANN, 1983).

Segundo Kettering e Torabinejad (1984), os fibroblastos humanos são muito utilizados em estudos de citotoxicidade de materiais odontológicos e têm sido considerados mais sensíveis do que outras linhagens celulares. Os autores investigaram a citotoxicidade de cimentos endodônticos em fibroblastos (L – 645) e em células cancerígenas (HeLa), porém, os dois tipos celulares não mostraram muitas diferenças em relação à sensibilidade.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* representam um passo necessário para testar novos materiais para uso humano. Embora os testes variem consideravelmente na maneira em que a citoxicidade é mensurada, a maioria emprega células que estão transformadas ou originadas de tumor como o modelo para a resposta celular (FEIGAL *et al*., 1985). A partir dessa teoria, os autores realizaram uma pesquisa com o intuito de comparar uma linhagem de células transformadas (L929), comumente usadas em testes de citotoxicidade, com uma linhagem de células normais não-transformadas (fibroblastos de polpa humana) para estabelecer a resposta delas a testes de citoxicidade. As células foram expostas a 7 materiais odontológicos e os resultados mostraram maior sensibilidade das células normais, quando comparadas às células transformadas. Os pesquisadores concluíram que as células normais foram mais apropriadas para testar a toxicidade de materiais para uso humano.

A necessidade de materiais biocompatíveis implica na necessidade da realização de testes de toxicidade. A toxicidade de um material odontológico pode ser avaliado por testes *in vitro*, experimentos utilizando animais e por estudos clínicos em humanos. Estudos *in vitro* são principalmente realizados para avaliar a citotoxicidade (dano celular) e a genotoxicidade (dano ao DNA ou aberrações cromossômicas) de um dado material. Em comparação aos experimentos em animais e humanos, as vantagens dos testes *in vitro* incluem condições experimentais controladas, baixo custo e rapidez na obtenção dos resultados e inexistência de problemas éticos. As limitações são principalmente a ausência da simulação da situação *in vivo*, e a extrapolação dos dados obtidos para os casos clínicos (SCHMALZ, 1994).

O teste Alamar Blue consiste em um método utilizado para mensurar a proliferação celular. O mesmo apresenta diversas vantagens como simplicidade de uso, pois o indicador é adicionado diretamente nas células em cultura pouco antes do final do período de incubação e reagentes ou manipulações adicionais não são

necessários; o corante utilizado não é tóxico para células nem para usuários; o teste não requer manejo especial ou emprego de métodos, uma vez que nenhum material radioativo ou tóxico é utilizado; como conseqüência, ele tem custo menor do que os testes tradicionais; pode ser adaptado para uma ampla escala de testes *in vitro*. Vários pesquisadores têm relatado que o teste é comparável aos testes tradicionais (incorporação timidina e MTT) para avaliação da proliferação celular e citotoxicidade (AHMED *et al*., 1994; NAKAYAMA *et al*., 1997).

O teste de um passo Alamar Blue, também denominado resazurin, envolve a adição de um indicador redox (redução-oxidação) fluorogênico, para o crescimento de células em cultura. A forma oxidada do Alamar Blue é uma cor azul escura e tem pouca fluorescência intrínseca. Quando entra nas células, o corante se torna reduzido e muda a cor para vermelho. Essa forma reduzida é altamente fluorescente. O grau dessa conversão representa um reflexo da viabilidade celular e pode ser quantificado pela sua densidade óptica ou fluorescência para maior sensibilidade. A intensidade da cor vermelha reflete a extensão da proliferação celular (AHMED *et al*., 1994; NAKAYAMA *et al.*, 1997).

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material a ser testado direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células e, em tempo apropriado, observar as alterações celulares ocasionadas pelo produto. As alterações celulares podem ser observadas de diferentes modos, como por exemplo, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares provocadas pela ação de certas substâncias. O parâmetro mais utilizado para testar a toxicidade de um material é a avaliação da viabilidade celular que uma cultura de células apresenta após permanecer em contato com esse material (CIAPETTI *et al*., 1996).

Nakayama *et al*. (1997), com o objetivo de otimizar os parâmetros experimentais para avaliação da viabilidade de várias linhagens celulares utilizando teste Alamar Blue, estudaram o teste avaliando 3 linhagens celulares normais (inclusive fibroblastos da derme humana) e 11 linhagens de células cancerígenas. As células foram cultivadas em placas de 96 poços e várias diluições do Alamar Blue foram testadas (1/5, 1/10, 1/25, 1/50 e 1/100) em meio de crescimento, e foram realizadas leituras após 1, 3, 6 e 24 horas. Para a maioria das linhagens, a diluição de 1/25 e tempo de incubação de 3h foram considerados ótimos.

O teste Alamar Blue mede, quantitativamente, a proliferação celular pela incorporação do corante resazurin e apresenta vantagens que o tornam atrativo, pois é solúvel no meio de cultura, estável em solução, minimamente tóxico às células e produz mudanças que são facilmente medidas. Possui poucas limitações; uma delas refere-se que a alta concentração celular e prolongado tempo de cultura poderia mostrar inversão no processo de redução do resazurin; ainda, a presença de contaminantes microbianos poderia reduzir o corante e produzir resultados errôneos (LARSON *et al.*, 1997; PERROT *et al.*, 2003).

Larson *et al.* (1997) testaram o Alamar Blue para mensurar o metabolismo de células endoteliais de córnea de coelhos e compararam os resultados aos produzidos pelo teste de incorporação do ^{3}H timidina. As células foram cultivadas em placas com 96 poços, cuja densidade variou de 1250 a 40000 células por poço. Após 12 horas de incubação, o corante foi adicionado a cada poço e a medida de absorbância foi realizada de hora em hora, até 9 horas. Os resultados demonstraram que a redução do resazurin a resofurin variou proporcionalmente com o número de células e tempo, demonstrando que a atividade metabólica das células é que foram responsáveis por essa redução. Inversamente, o ^{3}H timidina demonstrou pouca ou nenhuma habilidade em distinguir número ou viabilidade celular. Concluiu-se a superioridade do Alamar Blue em detectar a viabilidade pelo metabolismo das células endoteliais, além de ser não-tóxico e não-radiativo.

Existem vários sistemas de biotestes para a quantificação de número de células, sobrevivência celular ou proliferação celular. A contagem celular direta fornece uma medida direta do número de células, porém, consome muito tempo e são impraticáveis quando se tem um grande número de amostras. Em contraste, a quantificação celular indireta baseada na incorporação de radionucleotídeo, ácido nucléico total, proteína total, biomassa celular ou atividade celular metabólica pode ser facilmente automatizada. A incorporação do ^{3}H timidina oferece uma excelente sensibilidade e reprodutividade, porém, esse teste apresenta inconvenientes tais como: necessitar de equipamento especializado e requerer precaução na manipulação e técnicas de descarte. Corantes vitais detectam ácidos nucléicos, proteínas e outros constituintes de todas as células (saudáveis, injuriadas ou mortas), podendo levar a uma superestimação do número de células viáveis (VOYTIK-HARBIN *et al.*, 1998). O Alamar Blue, corante de indicador metabólico, apresenta excelentes vantagens na quantificação celular, pois é não-radiativo, não-

tóxico, solúvel em água, permite rápida avaliação de um grande número de amostras e é facilmente detectável por espectroscopia de absorbância ou fluorescência (VOYTIK-HARBIN *et al.*, 1998, PERROT *et al.*, 2003).

Voytik-Harbin *et al.* (1998) estudaram o teste Alamar Blue na quantificação da proliferação de fibroblastos 3T3 de camundongos e compararam os resultados a dois testes tradicionais: MTT e incorporação do ^{3}H timidina. Aos testarem várias concentrações do Alamar Blue (2,5 a 20,0%) em culturas, encontraram que a concentração ideal a ser utilizada é de 10,0 a 12,5%, sendo que concentrações maiores podem se tornar tóxicas às células ou alterar o metabolismo das mesmas. Quanto ao modo de leitura do Alamar Blue (absorbância ou fluorescência), ambos os métodos ofereceram excelentes resultados. Quanto à análise comparativa dos 3 testes, pouca diferença foi observada, apresentando correlação positiva entre o parâmetro mensurado e o número de células. Os autores concluíram que o presente teste ofereceu diversas vantagens como simplicidade da técnica, ser livre de radioisótopos, versatilidade na leitura e excelente sensibilidade e reprodutividade. Segundo os pesquisadores, quando usado sozinho ou em conjunto com outros biotestes, consiste em uma ferramenta útil na investigação de mecanismos complexos de proliferação celular.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis para avaliação dos efeitos biológicos de um material odontológico, porém, apresentam limitações como a dificuldade de comparar os resultados encontrados nesses testes com a realidade das situações clínicas. Por um outro lado, interpretações comparativas dos dados de toxicidade *in vitro* fornecem informações valiosas em relação ao potencial tóxico das substâncias (KOULAOUZIDOU *et al.*, 1999). Nenhum dos modelos de estudo descritos para avaliação das propriedades biológicas da própolis pode ser considerado idêntico a uma situação clínica na qual o produto é empregado, portanto, experiências clínicas são essenciais.

O teste de redução do resazurin (nome original para Alamar Blue) tem sido usado por aproximadamente 50 anos para monitorar contaminação bacteriana e fúngica do leite e para avaliar a qualidade do sêmen. Na realização do experimento para obter a viabilidade de culturas celulares, o corante resazurin (azul e não-fluorescente) é reduzido a resofurin (rosa e altamente fluorescente), que é mais tarde reduzido a hidroresofurin (incolor e não-fluorescente) (O'BRIEN *et al.*, 2000). Não é ainda conhecido como essa redução ocorre, se intracelularmente via atividade

enzimática ou no meio como uma reação química, embora a forma fluorescente reduzida do Alamar Blue tenha sido encontrada no citoplasma e núcleo de células vivas. Tem ganhado popularidade como um método simples e versátil de mensurar a proliferação celular e citotoxicidade (O'BRIEN *et al.*, 2000, PERROT *et al.*, 2003).

Perrot *et al.* (2003) avaliaram a toxicidade *in vitro* de 3 surfactantes e 6 álcoois, entre eles etanol e propilenoglicol, em células de córnea de porco, utilizando o teste resazurim a 10% e compararam com dados coletados *in vivo*. Os autores concluíram que esse teste foi efetivo na avaliação toxicológica de irritantes oculares, visto que os resultados encontrados *in vitro* foram similares aos encontrados *in vivo*.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste a ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Posteriormente, comprovada a sua não toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do produto poderá ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO *et al.*, 2003).

Os testes de citotoxicidade, *in vitro,* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a habilidade intrínseca de um composto causar alterações e morte celular, como conseqüências de dano das funções celulares básicas. Esses ensaios de citotoxicidade apresentam boa reprodutividade, fácil execução e baixo custo relativo, além de causar redução do número de animais para avaliação de toxicidade (VALADARES, 2006).

3 OBJETIVOS

a) Identificar os compostos químicos mais expressivos nas frações hexânica e acetato de etila do extrato etanólico de própolis do tipo verde de *Apis mellifera*, proveniente do estado de Mato Grosso do Sul;

b) Avaliar a proliferação e morte dos fibroblastos, a curto prazo, em contato com soluções hidroalcoólicas de própolis;

c) Verificar a sobrevivência a longo prazo dessas células;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (protocolo nº 1259, Anexo A).

Todos os experimentos com as culturas celulares foram realizados sob capela de fluxo laminar (Quimis ISO 9002, Q-216F20).

O protocolo de cultura celular utilizado foi baseado em Freshney (1990), adotado pelo Laboratório de Bioodontologia da Universidade Ibirapuera.

4.1 Amostra de própolis

Esta pesquisa foi realizada com uma amostra de própolis verde bruta de abelhas *Apis mellifera*, coletada no Apiário Vovô Pedro, localizado no município de Campo Grande (Mato Grosso do Sul - Brasil), cuja origem sugestiva foi a espécie botânica *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo). A amostra, até a preparação do extrato, foi armazenada em frasco plástico, hermeticamente fechado, sob temperatura de aproximadamente 4ºC.

4.2 Linhagem de células

Foram utilizados fibroblastos de mucosa bucal humana, denominados FLM, cedidos pelo Banco de Células do Laboratório de Bioodontologia da Universidade Ibirapuera – São Paulo (Anexo B). Essas células estavam mantidas sob congelamento, a -70ºC, em nitrogênio líquido (VOLTA 20, MVE, EUA), em meio de Eagle, modificado por Dulbecco, e Di-metil-sulfóxido – DMSO (Sigma Chemical Company, St Louis MO, EUA).

Para o crescimento dessas células em laboratório, foram necessários requisitos básicos, tais como:

- Meio de cultura apropriado: foi utilizado o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco - DMEM (Cultilab Mat. Cult. Cel. Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino - SBF (Cultilab Mat. Cult. Cel. Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil), cuja função foi adicionar ao meio vários fatores de crescimento. A presença de antibióticos e antifúngicos foi importante a fim de evitar contaminações, portanto, fez-se necessário o uso de Sulfato de Gentamicina - 50mg/L (Cultilab Mat. Cult. Cel. Ltda, data de fabricação 15/12/2004) e Anfotericina B - 2mg/L (Cultilab Mat. Cult. Cel. Ltda, data de fabricação 10/10/2007).

- Temperatura e umidade controladas: a suspensão celular foi mantida em estufa de cultivo (SANYO) a 37ºC (temperatura corporal do ser humano de onde as células foram retiradas), numa atmosfera úmida contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2.

4.3 Resazurin ou Alamar Blue

Para a leitura da viabilidade celular a curto prazo e proliferação celular em longo prazo, foi utilizado um corante denominado Resazurin ou Alamar Blue a 10% (Resazurin sodium salt 2100 µM, Sigma, EUA), cuja leitura foi a de absorbância em monocromador - UVM 340 (Asys, Áustria).

4.4 Preparação do extrato etanólico de própolis

A própolis bruta (550g) foi triturada manualmente e submetida à extração exaustiva em etanol PA (Chenco, Brasil), durante quatro dias (extração por maceração), com auxílio de ultrassom (Thorton, Modelo T14, EUA). Decorrido esse período, o material foi filtrado em filtro de papel absorvente, descartando-se a parte sólida (cera) (Figura 1). A parte líquida foi submetida à destilação sob pressão reduzida em rotaevaporador (Fisatom, EUA) para a retirada do solvente (Figura 2). Posteriormente, foi colocada em capela até a secagem completa do extrato, que após alguns dias foi pesado, resultando em 204,7g de extrato etanólico.

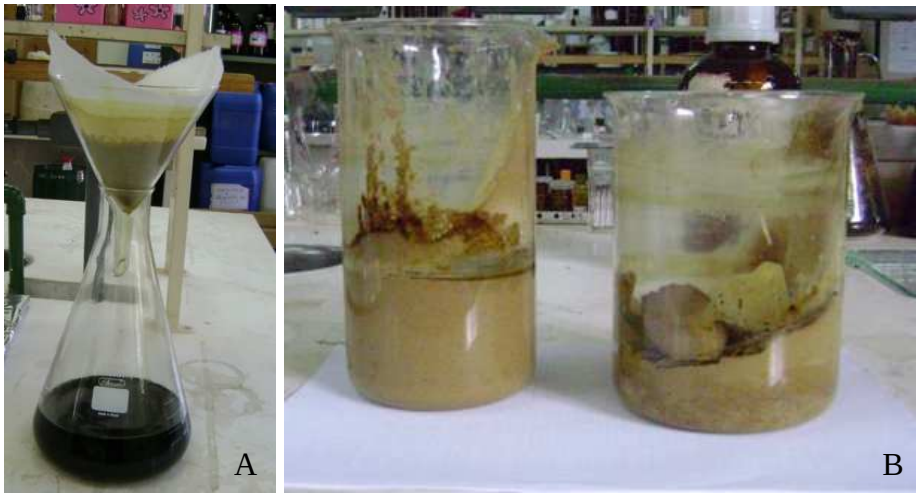


Figura 1 – Preparação do EEP: em A) filtragem do EEP; em B) Resíduo sólido (cera) obtido após filtração.

Figura 2 – Remoção do solvente em rotaevaporador.

4.5 Análise química da própolis

Para a análise química do extrato, o mesmo foi submetido à partição líquido-líquido, que separou as substâncias presentes de acordo com a polaridade. Dessa partição, originou-se as frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica (Figura 3), as quais foram submetidas à destilação sob pressão reduzida (rotaevaporador) para a retirada do solvente.

Para o fracionamento em cromatografia de coluna (CC), foi utilizada sílica gel 60 (70 - 230 Mesh), preparada pela homogeneização da sílica com o eluente apropriado, sendo posteriormente empacotada em coluna com mesmo solvente.

O comprimento e o diâmetro das colunas foram estabelecidos com base nas quantidades das amostras e de sílica gel utilizadas.

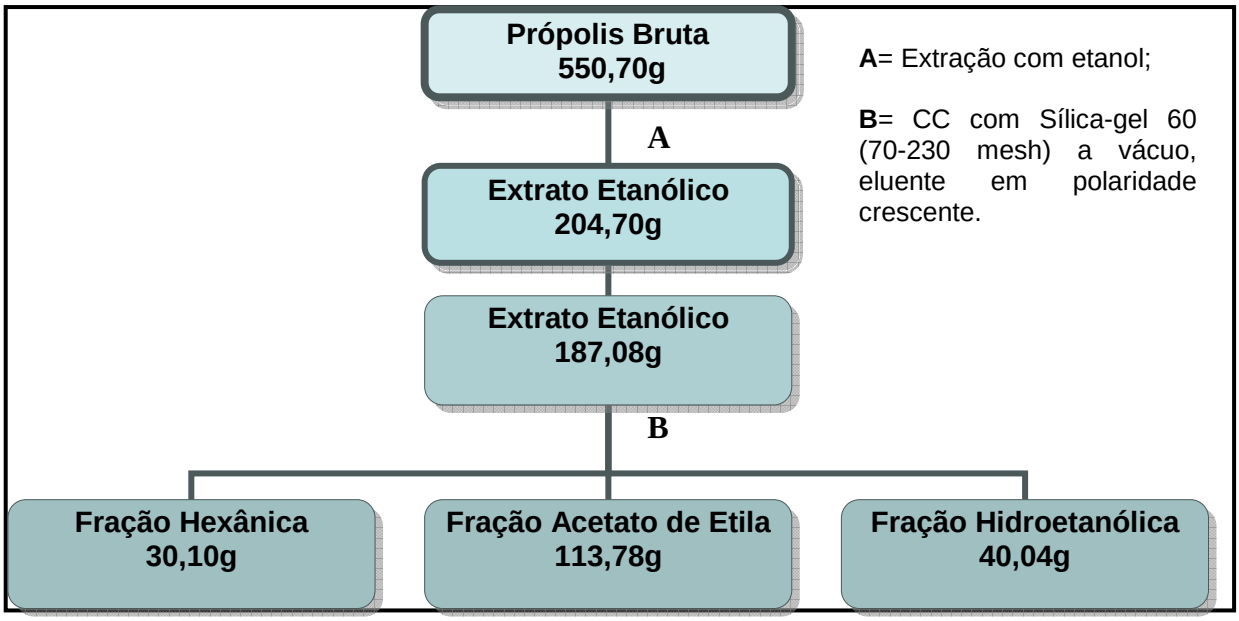


Figura 3 – Representação esquemática da extração em etanol e partição líquido-líquido da própolis.

Foram analisadas apenas as frações hexânica e acetato de etila, as quais foram submetidas à análise química utilizando-se Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) em diferentes sistemas de eluentes, sendo escolhido o sistema que apresentou uma melhor resolução das manchas nas placas cromatográficas. Posteriormente, essas frações foram submetidas à análise espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^{1}H) e Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN ^{13}C), das quais se verificou um perfil espectroscópico com característica de compostos alifáticos para a fração hexânica, e compostos aromáticos para a fração acetato de etila.

Os reveladores utilizados em CCDA foram ultra-violeta visível e solução de vanilina. Os solventes utilizados em CC, CCDA foram da marca Synth, Quimex e Merck. Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em

aparelho da marca Bruker modelo DPX – 300, sendo os espectros de RMN ^{1}H a 300 MHz e os de RMN de ^{13}C, a 75MHz (POLO *et al.*, 2008).

4.5.1 Fracionamento da fração hexânica do EEP

A fração hexânica foi submetida à CC de sílica gel 60 (70-230 mesh) (Figura 4), utilizando-se como eluentes, hexano/acetato de etila em polaridade crescente, originando 47 frações (Figura 5). Estas foram acompanhadas por placas cromatográficas (Figura 6) e reunidas de acordo com a semelhança de fator de referência (rfs). A fração 9 foi selecionada após avaliação das manchas da placa cromatográfica e encaminhada para fazer experimentos de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C para elucidação das estruturas moleculares. A análise permitiu observar algumas classes de substâncias.

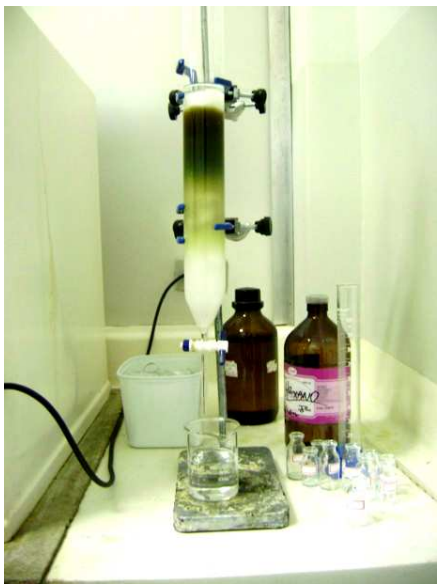


Figura 4 – Cromatografia de coluna de sílica gel da fração hexânica do EEP.

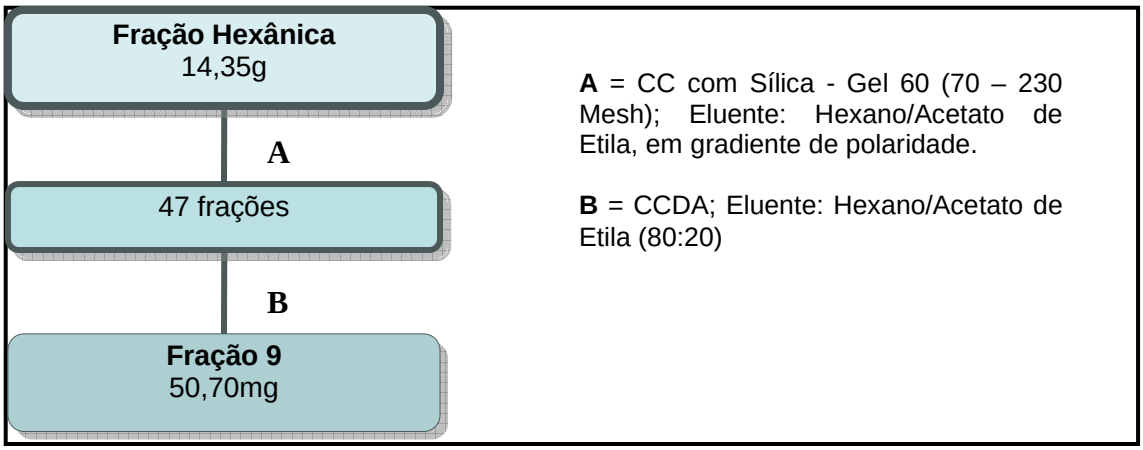


Figura 5 – Representação esquemática do fracionamento da fração hexânica do EEP.

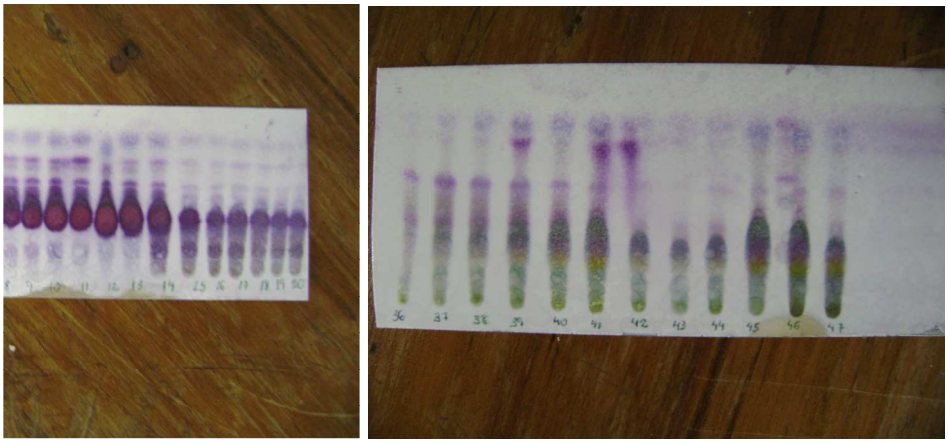


Figura 6 – Placas cromatográficas das frações da fração hexânica da própolis (frações 8-20 e 36-47).

4.5.2 Fracionamento da fração acetato de etila do EEP

A fração acetato de etila foi cromatografada em CC, utilizando-se fase reversa, sendo utilizado os eluentes metanol (MeOH), metanol/acetato de etila (MeOH/AcOEt), acetato de etila (AcOEt) e clorofórmio ($CHCl_3$) em ordem decrescente de polaridade. As substâncias foram monitoradas em placas cromatográficas e reunidas conforme semelhanças, originando cinco frações (Figura 7).

Essas frações foram submetidas à CCDA, sendo que a fração 3 apresentou um melhor perfil cromatográfico, o qual foi comprovado por meio de espectros de RMN ^{1}H.

A fração 3 foi submetida a CC sílica gel 60 (70-230 Mesh), utilizando os eluentes clorofórmio/metanol em polaridade crescente, da qual originou 30 frações, sendo que as frações 3-20, 3-23 e 3-28, apresentaram o melhor perfil cromatográfico. Essas frações foram submetidas à CC Sephadex LH-20 e o eluente empregado foi metanol, obtendo-se respectivamente 19, 26 e 17 frações. Todas as frações foram submetidas à CCDA. Este procedimento cromatográfico resultou no isolamento de três substâncias (Figura 7).

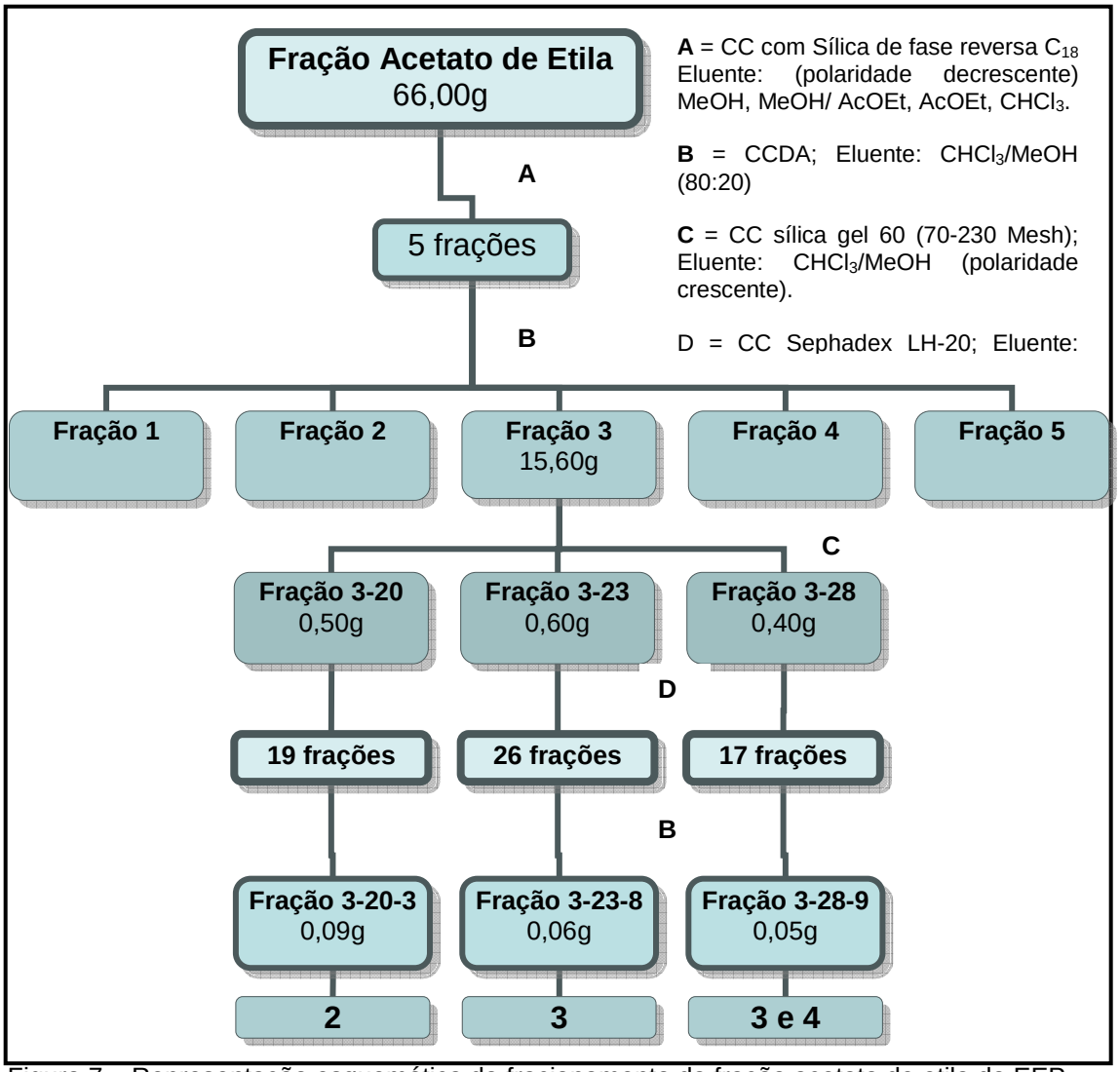


Figura 7 – Representação esquemática do fracionamento da fração acetato de etila do EEP.

4.6 Preparo da cultura de células

Para a utilização da linhagem de células FLM da mucosa bucal humana, realizou-se inicialmente o descongelamento das células. Para isto, um tubo criogênico (Sigma) contendo as células congeladas FLM (4ª passagem) foi retirado do nitrogênio líquido e rapidamente descongelado (90 segundos) em banho de água (banho Maria 102 R FANEM® - São Paulo – Brasil) a 37ºC. Para remover a substância crioprotetora (Di-metil-sulfóxido - DMSO), o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 2mL do meio de cultura (DMEM) e em seguida, centrifugado (Centrífuga Excelsa Baby II, modelo 206 - FANEM® - São Paulo – Brasil) a 1000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e o precipitado de células (pellet) (Figura 8), resultante da centrifugação, foi ressuspendido em 1mL de meio de cultura fresco e transferido para um frasco plástico de cultivo celular de 25cm^2 (Costar), contendo 10mL de meio de cultura fresco. O meio de cultura utilizado foi o de Eagle, modificado por Dulbecco, contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

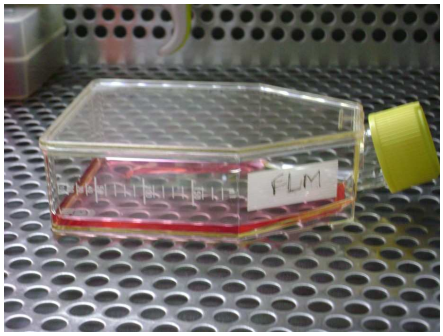
A suspensão celular foi mantida em estufa a 37ºC, numa atmosfera úmida contendo 95% de O_2 e 5% de CO_2. A troca do meio de cultura foi realizada a cada dois dias e a monitorização do crescimento celular realizou-se a cada 24 horas, utilizando-se microscópio invertido de fase (Nikon Eclipse TS 100), onde se observou a morfologia e o comportamento dos fibroblastos (aderência e proliferação), até a obtenção de um número satisfatório de células em cultura, definido pelas células com alta atividade mitótica e não confluentes, ocupando aproximadamente 2/3 da capacidade do frasco, quando, então, prosseguiu-se a replicação das células (subcultivo).

Figura 8 – Pellet formado após centrifugação

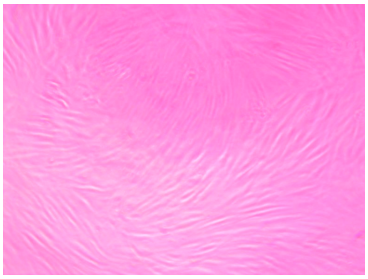
4.7 Subcultivo, passagem ou replicação

O subcultivo é determinado pela passagem de células de um frasco para outros, o que implica em subdivisão de uma população celular proliferativa. Para o subcultivo, os frascos plásticos foram retirados da estufa e logo em seguida, retirou-se todo o meio de cultura do seu interior utilizando pipetas graduadas. Ao frasco contendo as células, foi adicionado 5mL de uma solução de tripsina 0,25% (ATV – Solução de tripsina 0,2% e Versene 0,02% - filtrado em membrana 0,22µ, Instituto Adolfo Lutz – seção de culturas celulares, Lote nº 08, Fabricação 14/01/2009), que permaneceu durante 5 minutos a 37ºC (estufa de cultivo).

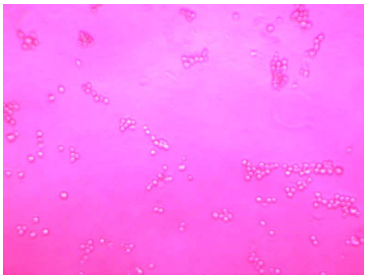
Em microscópio invertido de fase, observou-se o desprendimento das células e, então, inativou-se a tripsina com a adição de 5mL de DMEM, acrescido com 10% de SBF. As células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 1000rpm durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aspirado e os precipitados de células (pellets) resultantes da centrifugação foram ressuspendidos em 1mL de DMEM fresco. Para a perpetuação da linhagem celular, frações dessa suspensão de células foram subcultivadas em novos frascos, procedimento esse que deu origem a novas passagens da cultura (Figura 9).



Frasco de 25cm^2, contendo meio de cultura e células aderidas ao fundo



Tripsina



Células aderidas

Células em suspensão

4 novos frascos de cultura – Nova passagem

Figura 9 – Representação esquemática de subcultivo, para realização dos testes de curto e longo prazo.

4.8 Determinação do número de células presentes em cada frasco

Para a determinação do número de células existentes nos frascos, os precipitados (pellets) foram ressuspendidos em 1mL de DMEM fresco e 0,1mL dessa suspensão celular foi dispensado em tubo de ensaio, sendo adicionado 0,8mL de DMEM fresco e 0,1mL de azul de Trypan. Posteriormente, algumas gotas dessa suspensão celular foram transferidas para o hemocitômetro/câmara de Neubauer (Boeco-Germany) (Figura 10). A seguir, com a ajuda do microscópio invertido de fase, realizou-se a contagem celular, onde as células mortas foram evidenciadas pela coloração azulada, enquanto as vivas mantiveram-se despigmentadas (Figura 11).

O número total de células provenientes do frasco original foi obtido através da seguinte equação:

$$\text{Número total de células} = \frac{\text{Número total de células contadas X diluição X } 10^4}{\text{Número de quadrados usados para a contagem}}$$

Figura 10 – Câmara de Neubauer para contagem de células.

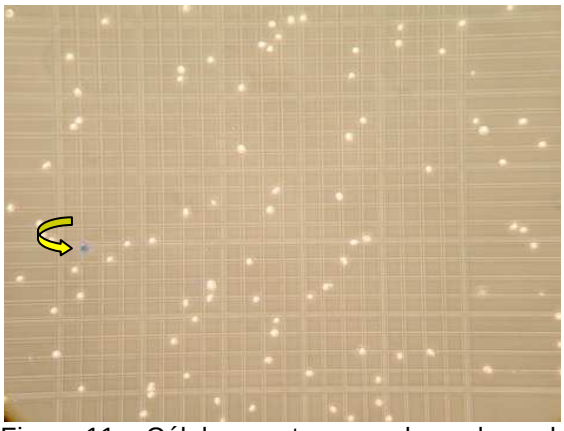


Figura 11 – Células mortas, coradas pelo azul de Trypan (seta). Células viávies, não coradas.

4.9 Preparo das soluções-estoque de própolis

Para os experimentos de viabilidade celular a curto prazo e sobrevivência celular em longo prazo foram testadas 2 soluções com própolis (uma em veículo

hidroalcoólico com propilenoglicol e uma em veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol) e 2 soluções sem a própolis (apenas os veículos). As diluições de própolis foram feitas de forma proporcional a partir da solução-estoque (diluição seriada), até se obter as diluições que foram utilizadas no trabalho.

Para o preparo das diluições, inicialmente foram preparadas 4 soluções-estoque (Figura 12):

Soluções-estoque	Composição	Veículos
1	Própolis a 3% diluída em veículo hidroalcoólico com propilenoglicol	5% de propilenoglicol, 20% de etanol e 75% de água destilada
2	Veículo hidroalcoólico com propilenoglicol	5% de propilenoglicol, 20% de etanol e 75% de água destilada
3	Própolis a 3% diluída em veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol	20% de etanol e 80% de água destilada
4	Veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol	20% de etanol e 75% de água destilada

Figura 12 – Soluções-estoque e porcentagem dos componentes.

Todas as soluções foram colocadas em agitador mecânico para a completa diluição dos componentes no meio. Após a homogeneização, todas as soluções foram transferidas para a capela de fluxo laminar, onde foram esterilizadas em filtro de seringa Milipore (poros de 0,22µm) (Figura 13) e acondicionadas em frascos autoclavados, os quais foram vedados e acondicionados em geladeira, cobertos com papel alumínio, a fim de evitar qualquer alteração da substância em contato com a luminosidade.

As concentrações utilizadas no experimento foram obtidas por diluições seriadas, a partir das soluções-estoque. Todas as concentrações foram preparadas e utilizadas no momento do experimento, quando do ensaio de curto prazo ou a cada troca de meio na avaliação de longo prazo.

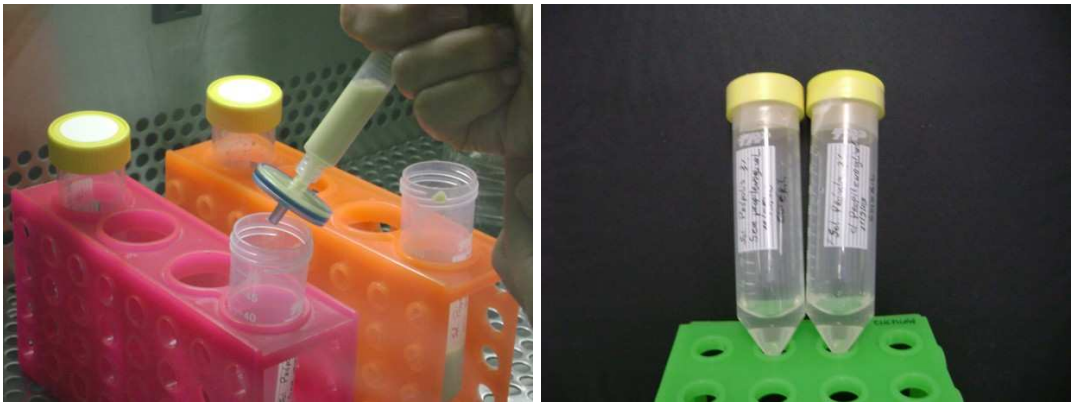


Figura 13 – Esterilização das soluções-estoque com filtro Milipore (0,22µm).

4.10 Soluções experimentais

Para os experimentos de viabilidade celular ou testes de citotoxicidade a curto e longo prazo, foram utilizadas células FLM entre o 5º e 7º subcultivos. Para os experimentos, foram cultivadas as células sob subnutrição a fim de mimetizar, *in vitro,* a situação dos fibroblastos, que geralmente estão expostos ao ambiente bucal em tecidos lesionados e, portanto, sob estresse. O estresse *in vitro* foi obtido pela diminuição da concentração de soro fetal bovino no meio de cultura, utilizando meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. As diluições de própolis e seus veículos foram realizados de forma proporcional em DMEM 5% SBF, até obter as concentrações que foram utilizadas no estudo. O experimento foi realizado sob fluxo laminar, seguindo os padrões de rotina do Laboratório de cultura celular.

O comportamento celular foi verificado com 12 soluções diferentes para cada veículo no teste de viabilidade celular a curto prazo, em triplicata para cada concentração, conforme descritas nas figuras 14 e 15.

Para o teste de sobrevivência celular a longo prazo, foram realizadas 3 proliferações (1ª, 2ª e 3ª), em momentos diferentes, a fim de tornar os resultados mais confiáveis e, em cada proliferação, cada concentração foi testada em triplicata. Neste teste, o comportamento celular foi verificado com 8 soluções diferentes (0,001%, 0,01% e 0,1%), conforme figuras 16 e 17.

Soluções	Experimento	Abreviatura
S I	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,001%.	**P 0,001% + V/PG 0,03%**
S II	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,03%.	**V/PG 0,03%**
S III	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,01%.	**P 0,01% + V/PG 0,33%**
S IV	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,33%.	**V/PG 0,33%**
S V	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,1%.	**P 0,1% + V/PG 3,33%**
S VI	Células crescidas contendo o veículo diluído a 3,3%.	**V/PG 3,33%**
S VII	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,5%.	**P 0,5% + V/PG 16,5%**
S VIII	Células crescidas contendo o veículo diluído a 16,5%.	**V/PG 16,5%**
S IX	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 1%.	**P 1% + V/PG 33%**
S X	Células crescidas contendo o veículo diluído a 33%.	**V/PG 33%**
S XI	Controle positivo; células crescidas, na ausência de própolis e do veículo.	**C +**
S XII	Controle negativo; células crescidas na presença de solução de triton 10%.	**C -**

Figura 14 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico com propilenoglicol (veículo 1 – Placa X), no teste a curto prazo.

Soluções	Experimento	Abreviatura
S I	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,001%.	**P 0,001% + V 0,03%**
S II	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,03%.	**V 0,03%**
S III	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,01%.	**P 0,01% + V 0,33%**
S IV	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,33%.	**V 0,33%**
S V	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,1%.	**P 0,1% + V 3,33%**
S VI	Células crescidas contendo o veículo diluído a 3,3%.	**V 3,33%**
S VII	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,5%.	**P 0,5% + V 16,5%**
S VIII	Células crescidas contendo o veículo diluído a 16,5%.	**V 16,5%**
S IX	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 1%.	**P 1% + V 33%**
S X	Células crescidas contendo o veículo diluído a 33%.	**V 33%**
S XI	Controle positivo; células crescidas, na ausência de própolis e do veículo.	**C +**
S XII	Controle negativo; células crescidas na presença de solução de triton 10%.	**C -**

Figura 15 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol (veículo 2 – Placa Y), no teste a curto prazo.

Soluções	Experimento	Abreviatura
S I	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,001%.	**P 0,001% + V/PG 0,03%**
S II	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,03%.	**V/PG 0,03%**
S III	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,01%.	**P 0,01% + V/PG 0,33%**
S IV	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,33%.	**V/PG 0,33%**
S V	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,1%.	**P 0,1% + V/PG 3,33%**
S VI	Células crescidas contendo o veículo diluído a 3,3%.	**V/PG 3,33%**
S VII	Controle positivo; células crescidas, na ausência de própolis e do veículo.	**C +**
S VIII	Controle negativo; células crescidas na presença de solução de triton 10%.	**C -**

Figura 16 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico com propilenoglicol (veículo 1 – Placa X), no teste a longo prazo.

Soluções	Experimento	Abreviatura
S I	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,001%.	**P 0,001% + V 0,03%**
S II	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,03%.	**V 0,03%**
S III	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,01%.	**P 0,01% + V 0,33%**
S IV	Células crescidas contendo o veículo diluído a 0,33%.	**V 0,33%**
S V	Células crescidas contendo a solução estoque de própolis diluída a 0,1%.	**P 0,1% + V 3,33%**
S VI	Células crescidas contendo o veículo diluído a 3,3%.	**V 3,33%**
S VII	Controle positivo; células crescidas, na ausência de própolis e do veículo.	**C +**
S VIII	Controle negativo; células crescidas na presença de solução de triton 10%.	**C -**

Figura 17 – Descrição das soluções de própolis em veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol (veículo 2 – Placa Y), no teste a longo prazo.

4.11 Teste de viabilidade celular a curto prazo

Nesta fase do experimento, as células crescidas nos frascos foram tripsinizadas e contadas para a determinação do número de células existentes no frasco original, conforme descrito anteriormente, a fim de proceder-se à diluição necessária para o plaqueamento exato.

Para o ensaio a curto prazo, os fibroblastos da mucosa foram semeados em placa de cultura de fundo chato com 96 poços (Costar) na quantidade de $1x10^3$ células/poço, mantidos em DMEM com 10% de SBF (0,2mL/poço) e, posteriormente, acondicionados em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 (estufa de cultivo) por 24 horas.

Decorrido esse período, a placa foi levada ao microscópio invertido para avaliação da viabilidade das células ou possível contaminação da mesma. Para este ensaio, foram utilizadas culturas que apresentavam uma monocamada celular uniforme e próxima à confluência. Após constatação positiva da viabilidade, foram preparadas as diluições das soluções-estoque de própolis em DMEM 5% SBF até a obtenção das concentrações a serem testadas (1%; 0,5%; 0,1%; 0,01% e 0,001%), as quais foram adicionadas às células após a retirada do meio, em triplicata, para cada concentração, sendo novamente incubadas (Figura 18). Os poços com controle positivo receberam somente o meio de cultura fresco (DMEM 5% SBF) e os poços com controle negativo receberam solução de triton 10% (4-fenilpolietilenoglicol) (Apêndice A).

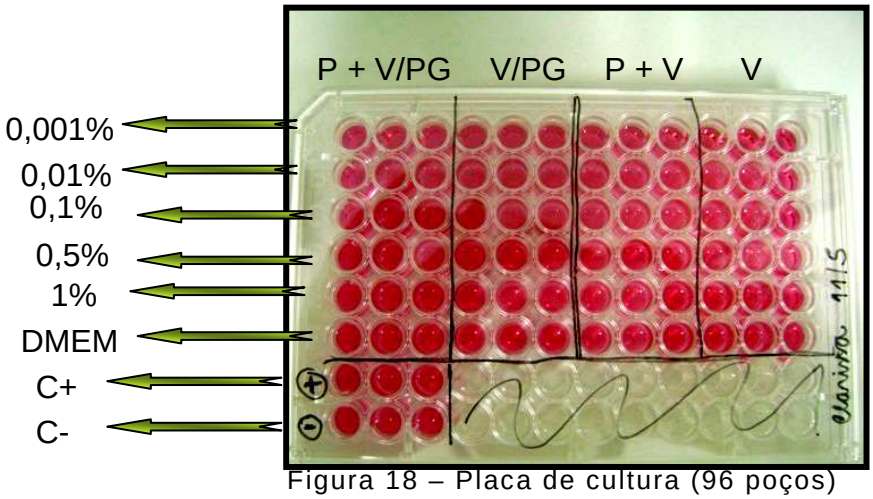


Figura 18 – Placa de cultura (96 poços)

Transcorridas 24 horas do condicionamento, as soluções de todos os poços foram removidas e os mesmos foram gentilmente lavados com solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBSA-1, Sigma), para retirada de células mortas e qualquer resto de solução que possa alterar a leitura futura. A citotoxicidade das concentrações foi determinada pela adição do revelador

resazurin. O revelador age como um indicador do crescimento celular e/ou viabilidade que para a resazurin, a cor azul representa a ausência de crescimento/inviabialidade celular e a cor rosa indica crescimento (AHMED *et al*., 1994). Assim, uma solução de resazurin (10%) foi colocada em cada poço (0,2mL por poço) (Figura 19). A placa com 96 poços foi acondicionada em estufa de cultivo e após 3 horas, procedeu-se a leitura de absorbância em monocromador - UVM 340 (570nm) (marca Asys, Áustria). A ação das concentrações sobre os fibroblastos cultivados foi analisada levando-se em consideração o crescimento celular após 24 horas do contato com o meio condicionado. Os dados foram então analisados e compilados em um gráfico.

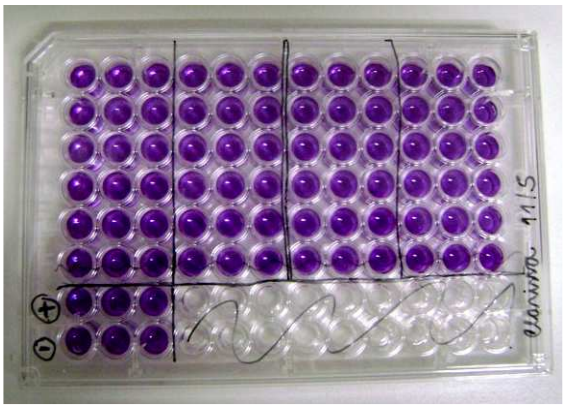


Figura 19 – Placa contendo células FLM, após colocação do revelador resazurin 10%.

4.12 Teste de sobrevivência celular a longo prazo

Após a realização do teste a curto prazo, os resultados foram analisados e em seguida, realizou-se o teste a longo prazo de três concentrações (0,001%, 0,01% e 0,1%), onde se observou a sobrevivência das células após 1, 3, 5 e 7 dias em contato com as concentrações de cada uma das quatro soluções. Em cada uma das proliferações, as concentrações foram analisadas em triplicata para cada solução e tempo experimental.

Para a realização das curvas de crescimento e de viabilidade celular, os fibroblastos da mucosa foram semeados em placas de cultura com 24 poços

(Costar) na quantidade de $1x10^4$ células/poço, mantidos em DMEM com 10% de SBF (0,5mL/poço), sendo acondicionadas em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 (estufa de cultivo).

Após 24 horas do plaqueamento, tempo esse necessário para as células aderirem às placas (visualizadas em microscópio invertido para avaliação da viabilidade das células ou possível contaminação das mesmas), as substâncias a serem testadas, nas concentrações pré-estabelecidas, foram colocadas após a aspiração do meio de cultivo celular. Os poços com controle positivo receberam somente o meio de cultura fresco (DMEM 5% SBF) e os poços com controle negativo receberam solução de triton 10% (Apêndice B).

Transcorridos os prazos estabelecidos de 1, 3, 5 e 7 dias do condicionamento, as soluções de todos os poços das placas devidamente identificadas foram removidas. Os poços foram delicadamente lavados com PBSA-1 e colocou-se a solução de resazurin 10% em cada poço (1mL por poço). As placas com 24 poços foram acondicionadas em estufa de cultivo e após 3 horas procedeu-se a leitura de absorbância em monocromador - UVM 340 (Asys, Áustria) (Figura 20). A ação das concentrações sobre os fibroblastos cultivados foi analisada levando-se em consideração o crescimento celular após 24, 72, 120 e 168 horas do contato com o meio condicionado. Os dados foram então analisados e compilados em gráficos.

Figura 20 – Monocromador UVM – 340 (Asys) para leitura de absorbância.

4.13 Análise estatística

Os dados das curvas de crescimento e de viabilidade celular foram apresentados como a média ± desvio padrão da média da triplicata do número de células viáveis de cada solução, em cada tempo experimental, das 3 proliferações. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste paramétrico ANOVA, com diferenciação dos grupos pela comparação múltipla pelo teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Compostos químicos identificados na própolis

A partir das 47 frações obtidas a partir da CC da fração hexânica, apenas a fração 9 foi encaminhada para fazer experimentos de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C (Apêndices C e D) para elucidação das estruturas moleculares, pois foi a única fração, desta fase, que pela placa cromatográfica, havia indícios de uma substância pura. Por meio dos dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C e comparação com a literatura, foi possível caracterizar as substâncias (Figura 21). Os espectros de RMN dos compostos encontrados na fração acetato de etila estão nos apêndices de E a J.

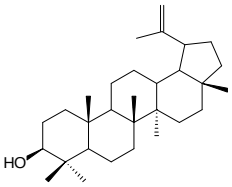
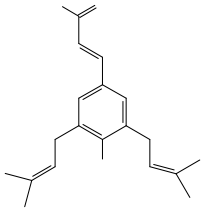
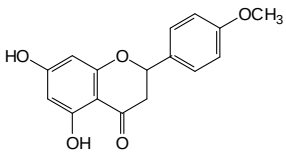
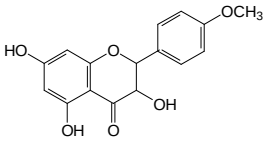
FASES	**Fase Hexânica**	**Fase Acetato de Etila**		
Composto Químico	Lupeol	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	5,7-diidroxi-4'-metoxiflavone (Acacetina)	3,5,7 trihidroxi-4'metoxiflavonol
Estrutura Química	Siddiqui *et al.*; 1988. 	Albuquerque *et al.*, 2007. 	Albuquerque *et al.*, 2007. 	Albuquerque *et al.*, 2007. 

Figura 21 – Substâncias identificadas pelas análises de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C nas fases hexânica e acetato de etila do EEP.

5.2 Viabilidade celular a curto prazo

Os valores referentes à viabilidade celular dos fibroblastos submetidos ao EEP em diferentes concentrações, com e sem propilenoglicol, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Porcentagem de células viáveis submetidas às diferentes concentrações do extrato etanólico de própolis, com e sem propilenoglicol

Soluções	Viabilidade Celular* (%)	Soluções	Viabilidade Celular* (%)
Própolis 0,001% + V/PG 0,03%	107,0	Própolis 0,001% + V 0,03%	106,0
Própolis 0,01% + V/PG 0,33%	100,0	Própolis 0,01% + V 0,33%	92,0
Própolis 0,1% + V/PG 3,33%	101,0	Própolis 0,1% + V 3,33%	98,0
Própolis 0,5% + V/PG 16,50%	47,0	Própolis 0,5% + V 16,50%	47,0
Própolis 1,0% + V/PG 33,00%	21,0	Própolis 1,0% + V 33,00%	21,0
Veículo + Propilenoglicol 0,03%	100,0	Veículo 0,03%	106,0
Veículo + Propilenoglicol 0,33%	93,0	Veículo 0,33%	99,0
Veículo + Propilenoglicol 3,33%	93,0	Veículo 3,33%	95,0
Veículo + Propilenoglicol 16,50%	51,0	Veículo 16,50%	79,0
Veículo + Propilenoglicol 33,00%	31,0	Veículo 33,00%	36,0
Controle positivo	100,0	Controle negativo	0,0

*Valores superiores a 100% indicam proliferação celular.

Observa-se que nas concentrações de 0,1%, 0,01% e 0,001%, as soluções e respectivos veículos causaram pouca ou nenhuma morte celular, com mais de 90% de viabilidade dos fibroblastos. Em algumas concentrações, pode-se verificar discreta proliferação dessas células. Os valores originais correspondentes à proporção de células viáveis, para cada solução experimental, em triplicata para cada concentração, são apresentados no Apêndice L. A figura 22 ilustra os dados apresentados na Tabela 1.

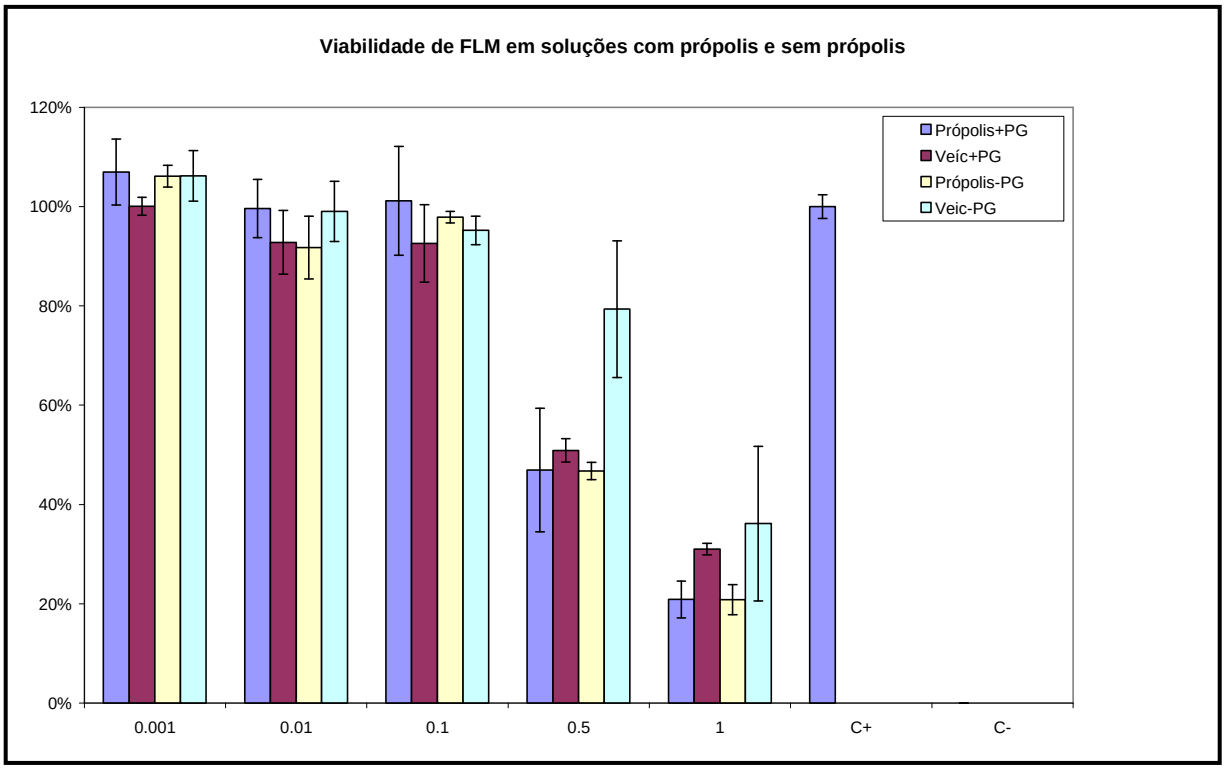


Figura 22 – Gráfico de colunas ilustrando a porcentagem da sobrevivência de fibroblastos nas soluções testadas a curto prazo.

5.3 Teste de sobrevivência celular a longo prazo

Após análise da viabilidade celular a curto prazo, optou-se por realizar o teste de sobrevivência celular a longo prazo de três concentrações da solução de própolis (0,1%; 0,01% e 0,001%), visto que as concentrações de 0,5 e 1,0% já manifestaram toxicidade no teste a curto prazo. Os valores originais do resultado do teste encontram-se nos Apêndices M e N.

A citotoxicidade das soluções de própolis e respectivos veículos com propilenoglicol - Placa X, e sem propilenoglicol - Placa Y, foi analisada pelo cruzamento dos dois fatores envolvidos na pesquisa: tempo experimental - 1, 3, 5 e 7 dias e soluções experimentais.

Os valores das médias e desvios-padrões amostrais da viabilidade celular relativos aos cruzamentos solução x tempo x proliferação estão expressos na Tabela 2. Os valores originais encontram-se no Apêndice O e P.

Tabela 2 – Média ± desvio-padrão da viabilidade celular de fibroblastos submetidos a diferentes concentrações do EEP

Placas / Soluções	COM PROPILENOGLICOL					SEM PROPILENOGLICOL				
	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias	**M±DP**	1 dia	3 dias	5 dias	7 dias	**M±DP**
P 0,001% + V/PG 0,03%	1,03±0,30	1,01±0,16	1,15±0,16	1,07±0,07	1,05±0,19	1,20±0,42	1,04±0,09	1,04±0,10	1,04±0,07	1,08±0,22
P 0,01% + V/PG 0,33%	1,22±0,26	1,02±0,12	1,09±0,12	1,04±0,09	1,09±0,19	1,18±0,28	0,97±0,12	1,05±0,09	1,01±0,09	1,04±0,17
P 0,1% + V/PG 3,33%	1,28±0,24	1,04±0,11	1,03±0,11	1,07±0,14	1,10±0,21	1,21±0,23	1,09±0,08	1,03±0,12	1,07±0,15	1,08±0,17
V/PG 0,03%	1,08±0,32	1,05±0,10	1,23±0,10	1,05±0,05	1,08±0,18	1,09±0,32	1,02±0,09	1,09±0,14	1,03±0,05	1,04±0,18
V/PG 0,33%	1,08±0,34	0,97±0,16	1,01±0,16	0,89±0,10	0,99±0,23	0,87±0,18	0,94±0,09	0,98±0,07	0,98±0,10	0,94±0,12
V/PG 3,33%	1,09±0,28	0,82±0,17	0,72±0,17	0,66±0,15	0,82±0,24	0,99±0,53	0,86±0,21	0,82±0,16	0,70±0,15	0,85±0,19
C +	1,00±0,17	1,00±0,13	1,00±0,13	1,00±0,18	1,00±0,16	1,00±0,09	1,00±0,11	1,00±0,19	1,00±0,18	1,00±0,14
C -	0,00±0,14	0,00±0,07	0,00±0,07	0,00±0,03	0,00±0,08	0,00±0,14	0,00±0,04	0,00±0,02	0,00±0,03	0,00±0,07

P - própolis. V – veículo. PG – propilenoglicol. C + controle positivo. C – controle negativo.

A Tabela 3 mostra o resultado da análise de variância ANOVA para as soluções com e sem propilenoglicol, em função do tempo e soluções. O teste revelou que houve pelo menos um tempo e uma solução distinta das demais para as soluções com propilenoglicol e pelo menos uma solução distinta das demais para as soluções sem propilenoglicol. Não houve diferença significativa quando do cruzamento entre os fatores solução e tempo experimental. Os valores originais encontram-se nos Apêndices Q e R.

Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) da viabilidade celular entre as diferentes concentrações do EEP, em função das soluções e tempo

Fontes de Variação	**COM PROPILENOGLICOL**				**SEM PROPILENOGLICOL**			
	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	*p*	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	*P*
Soluções	11,603	7	1,658	**<0,001**	11,062	7	1,580	**<0,001**
Tempo	0,256	3	0,085	**0,035**	0,074	3	0,025	0,323
Soluções x Tempo	0,391	21	0,019	0,851	0,259	21	0,012	0,907

GL – Graus de liberdade. *p* – probabilidade.

A análise da tabela acima mostra que em relação às placas com propilenoglicol, houve pelo menos um tempo distinto dos demais. A fim de identificá-lo, realizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas entre os distintos tempos (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste de Tukey para comparações múltiplas entre os distintos tempos das soluções com propilenoglicol

(I) Tempo	(J) Tempo	Diferença das médias (I – J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de confiança	
					Limite superior	**Limite inferior**
24	72	,1125	,04836	,103	-,0151	,2401
	120	,0842	,04836	,312	-,0434	,2117
	168	**,1371***	**,04836**	**,030**	,0095	,2647
72	24	-,1125	,04836	,103	-,2401	,0151
	120	-,0283	,04836	,936	-,1559	,0992
	168	,0246	,04836	,957	-,1030	,1522
120	24	-,0842	,04836	,312	-,2117	,0434
	72	,0283	,04836	,936	-,0992	,1559
	168	,0529	,04836	,694	-,0747	,1805
168	**24**	**-,1371***	**,04836**	**,030**	-,2647	-,0095
	72	-,0246	,04836	,957	-,1522	,1030
	120	-,0529	,04836	,694	-,1805	,0747

* Resultado significante
Baseado nas médias amostrais observadas.
Erro quadrático médio = ,028.
A diferença de médias foi significante ao nível de 0,05.

Pela análise da tabela, verificou-se um resultado significante: a comparação de 24 com 168 horas. A proporção de células viáveis no período de 24 horas mostrou-se estatisticamente superior à verificada no período de 168 horas (7º dia), não apresentando diferenças significativas aos demais dias (3º e 5º). A diferença de proporção de 0,1371 entre 24 e 168 horas, quer dizer que o percentual de células viáveis do primeiro para o sétimo dia caiu em 13,71%, ou seja, com o passar do tempo em contato com as soluções, houve morte celular, porém, esta só foi significante após 7 dias de contato com as soluções com propilenoglicol (Figura 23).

É interessante salientar que pelo fato de os cruzamentos entre os fatores “tempo x solução experimental” não terem sido significantes, estas diferenças apresentadas acima podem ser estendidas a todas as concentrações de todas as soluções testadas, exceto nas soluções controles, que permaneceram estáveis com o passar do tempo.

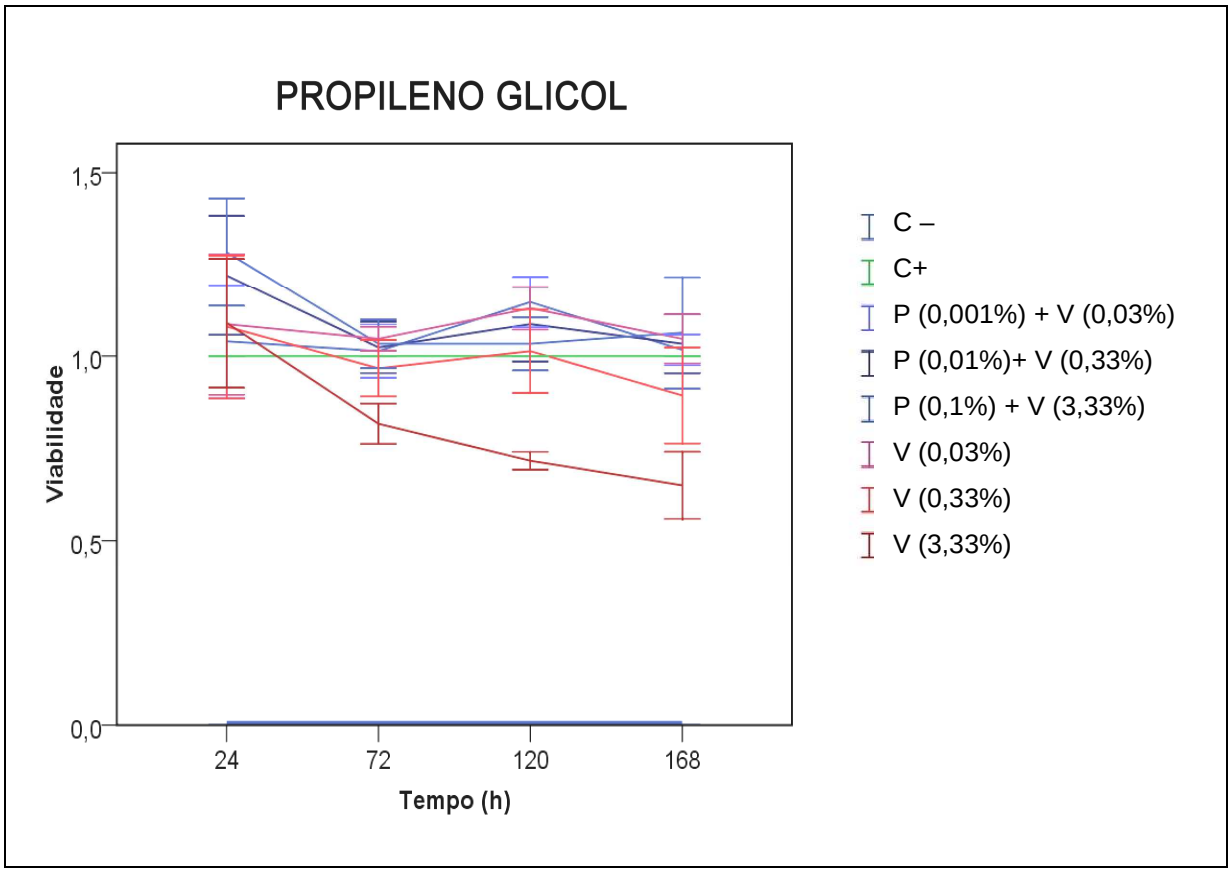


Figura 23 – Gráfico de linhas ilustrando a viabilidade celular das soluções de própolis e veículos com propilenoglicol (Placa X) nos diferentes períodos experimentais.

Uma vez que a análise de variância das soluções com propilenoglicol revelou que houve pelo menos uma solução experimental distinta das demais, realizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas entre estas soluções (Tabela 5). O teste comparando todas as soluções encontra-se no Apêndice S.

O grupo C–, que corresponde ao controle negativo, indicou diferença significativa em relação a todas as demais soluções, resultado este que já era esperado, visto que a solução triton 10% foi utilizada no intuito de matar todas as células, ao contrário das outras soluções empregadas. Além desse resultado, notou-se diferença estatisticamente significativa entre o V/PG 3,33% com todas as demais soluções, exceto V/PG 0,33% e C +. A proporção de células viáveis de V/PG 3,33% mostrou-se superior ao C – e inferior a todas as demais. Ou seja, em relação ao C - sobreviveram 81,83% mais células; com relação à solução P (0,001%) + V/PG (0,03%), sobreviveram menos 23,58%; relacionando a P (0,01%) + V/PG (0,33%), sobreviveram menos 27,25%; comparado ao P (0,1%) + V/PG (3,33%),

sobreviveram menos 28,50%; e por fim, em relação ao V/PG (0,03%), sobreviveram menos 25,92% de células.

Tabela 5 – Valores significantes no teste de Tukey na comparação múltipla entre as soluções com propilenoglicol

(I) Soluções	(J) Soluções	Diferença das médias (I – J)	Erro Padrão	*p*
P(0,001%)+V/PG (0,03%)	V/PG (3,3%)	,2358*	,06839	,021...
	C-	1,0542*	,06839	,000...
P(0,01%)+V/PG (0,33%)	V/PG (3,3%)	,2725*	,06839	,004...
	C -	1,0908*	,06839	,000...
P(0,1%)+V/PG (3,3%)	V/PG (3,3%)	,2850*	,06839	,002...
	C-	1,1033*	,06839	,000...
V/PG (0,03%)	V/PG (3,3%)	,2592*	,06839	,008...
	C-	1,0775*	,06839	,000...
V/PG (0,33%)	C-	,9883*	,06839	,000...
V/PG (3,3%)	P(0,001%) + V/PG (0,03%)	-,2358*	,06839	,021...
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	-,2725*	,06839	,004...
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	-,2850*	0,6839	,002...
	V/PG (0,03%)	-,2592*	,06839	,008...
	C-	,8183*	,06839	,000...
C +	C-	1,0000*	,06839	,000...
C -	P(0,001%) + V/PG (0,03%)	-1,0542*	0,6839	,000...
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	-1,0908*	0,6839	,000...
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	-1,1033*	,06839	,000...
	V/PG (0,03%)	-1,0775*	,06839	,000...
	V/PG (0,33%)	-,9883*	,06839	,000...
	V/PG (3,3%)	-,8183*	,06839	,000...
	C +	-1,0000*	,06839	,000...

Analogamente aos resultados relativos ao tempo, o fato de não haver significância nos cruzamentos entre os fatores “tempo x solução experimental”, indica que tais diferenças, numa análise global, foram independentes do número de dias do experimento.

O gráfico abaixo (Figura 24), mostra a proporção de células viáveis em cada tempo, para cada solução experimental com propilenoglicol, nas três concentrações pesquisadas, e seus respectivos veículos.

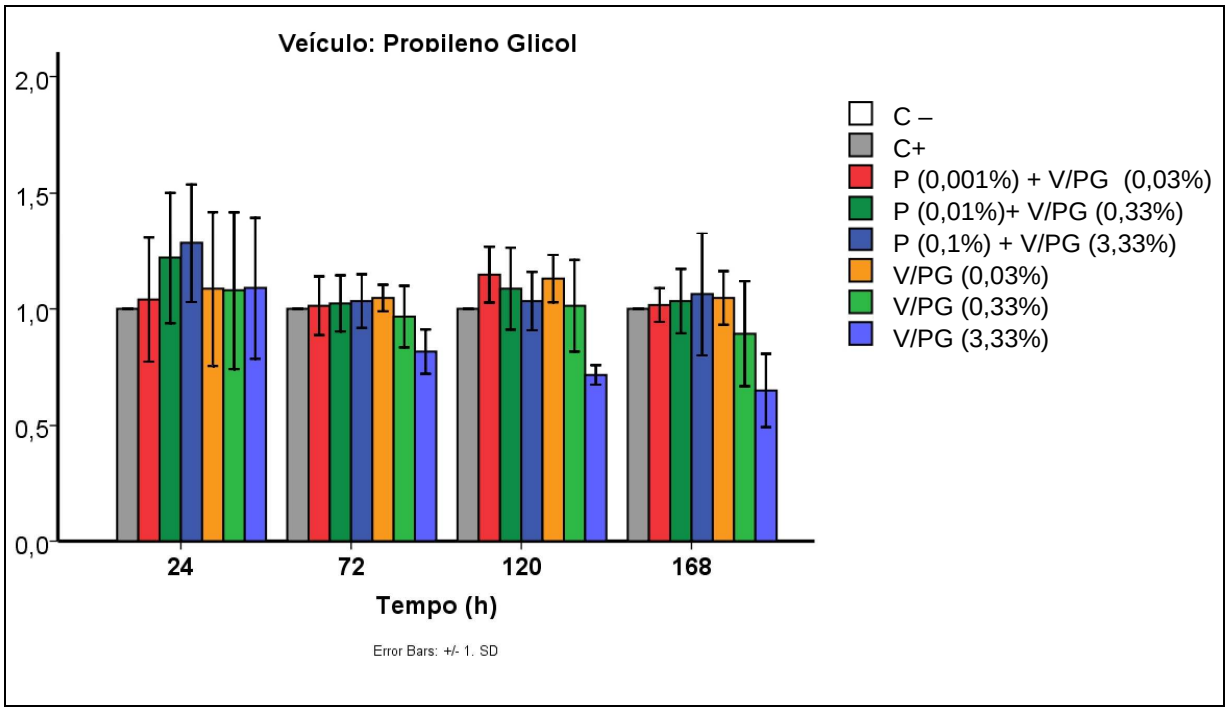


Figura 24 – Gráfico de colunas ilustrando a proporção da média da viabilidade celular no teste a longo prazo, nas soluções com propilenoglicol (Placa X).

Após análise dos resultados acima, como todas as soluções com própolis, apresentaram valores maiores que os controles positivos, pode-se afirmar que a própolis, nas concentrações do experimento, não foi tóxica aos fibroblastos da mucosa bucal e que podem até ter favorecido uma ligeira proliferação, o que poderia contribuir clinicamente no reparo de tecidos lesionados. Quanto aos veículos, nas mesmas concentrações utilizadas com as soluções com própolis, apenas o veículo hidroalcoólico com propilenoglicol, na concentração de 3,33%, apresentou menor viabilidade celular, sendo que a média das 3 proliferações realizadas, houve aproximadamente 18% de morte celular, e que ao final do sétimo dia de contato com a solução, 35% das células haviam morrido (Apêndice O). Quando em mistura com a própolis, não houve tal situação. Isso sugere que a própolis amenizou os danos provocados por este veículo.

Para a placa Y, a análise de variância (teste ANOVA) revelou que houve pelo menos uma solução experimental distinta das demais. Não foi constatado diferenças significativas entre os tempos (1, 3, 5 e 7 dias) e nem nos cruzamentos entre os fatores solução e tempo experimental (Tabela 3). A fim de identificar as soluções experimentais distintas, realizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas entre estas soluções (Tabela 6). Os valores originais encontram-se no Apêndice T.

Tabela 6 – Valores significantes no teste de Tukey na comparação múltipla entre as soluções sem propilenoglicol

(I) Soluções	(J) Soluções	Diferença das médias (I – J)	Erro Padrão	*p*
P(0,001%)+V (0,03%)	V (3,33%)	,2225*	,05878	,008...
	C-	1,0767*	,05878	,000...
P(0,01%)+V (0,33%)	C -	1,0375	,05878	,000...
P(0,1%)+V (3,3%)	V (3,33%)	,2283*	,05878	,006...
	C-	1,0825*	,05878	,000...
V (0,03%)	C-	1,0358*	,05878	,000...
V (0,33%)	C-	,9400*	,05878	,000...
V (3,3%)	P(0,001%) + V (0,03%)	-,2225*	,05878	,008...
	P(0,1%) + V (3,33%)	-,2283*	,05878	,006...
	C-	,8542*	,05878	,000...
C +	C-	1,0000*	,05878	,000...
C -	P(0,001%) + V (0,03%)	-1,0767*	,05878	,000...
	P(0,01%) + V (0,33%)	-1,0375*	,05878	,000...
	P(0,1%) + V (3,33%)	-1,0825*	,05878	,000...
	V (0,03%)	-1,0358*	,05878	,000...
	V (0,33%)	-,9400*	,05878	,000...
	V (3,33%)	-,8542*	,05878	,000...
	C +	-1,0000*	.05878	,000...

Na análise, o grupo C -, que corresponde ao controle negativo, indicou diferença significativa em relação a todas as demais soluções, resultado este que já era esperado, visto que a solução triton 10% foi utilizada no intuito de matar todas as células, ao contrário das outras soluções empregadas. Além desse resultado, notou-se diferença estatisticamente significativa entre o V 3,33% com P (0,001%) + V

(0,03%) e P (0,1%) + V (3,33%). A proporção de células viáveis de V 3,33% mostrou-se superior ao C – e inferior a todas as demais, porém, só foram significantes em comparação com 3 soluções, ou seja, em relação ao C -, no qual sobreviveram 85,42% mais células; com relação à solução P (0,001%) + V (0,03%) em que sobreviveram menos 22,25% e relacionando a P (0,1%) + V (3,33%), sobreviveram menos 22,83% de fibroblastos.

A figura 25 ilustra a proporção de fibroblastos viáveis nos diferentes dias do experimento. Observa-se que houve, com o passar do tempo, ora morte, ora proliferação das células, porém, insignificante estatisticamente.

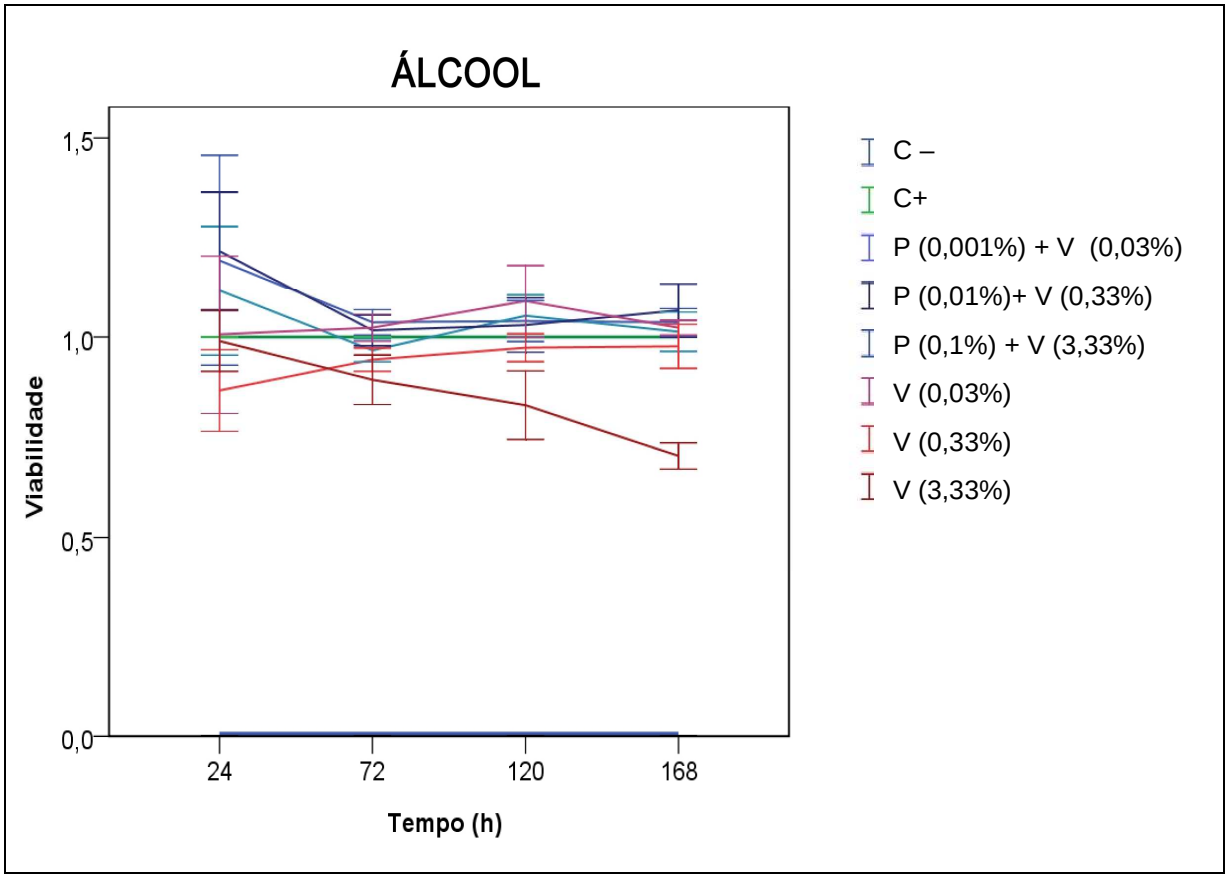


Figura 25 – Gráfico de linhas ilustrando a viabilidade celular das soluções de própolis e veículos sem propilenoglicol (Placa Y) nos diferentes períodos experimentais.

É importante o fato de não haver significância nos cruzamentos entre os fatores “tempo x solução experimental”, pois indica que tais diferenças, em uma análise global, foram independentes do número de dias do experimento (1, 3, 5 ou 7).

A figura 26 ilustra a proporção de células viáveis, em cada tempo, nas diferentes concentrações de cada solução experimental sem propilenoglicol.

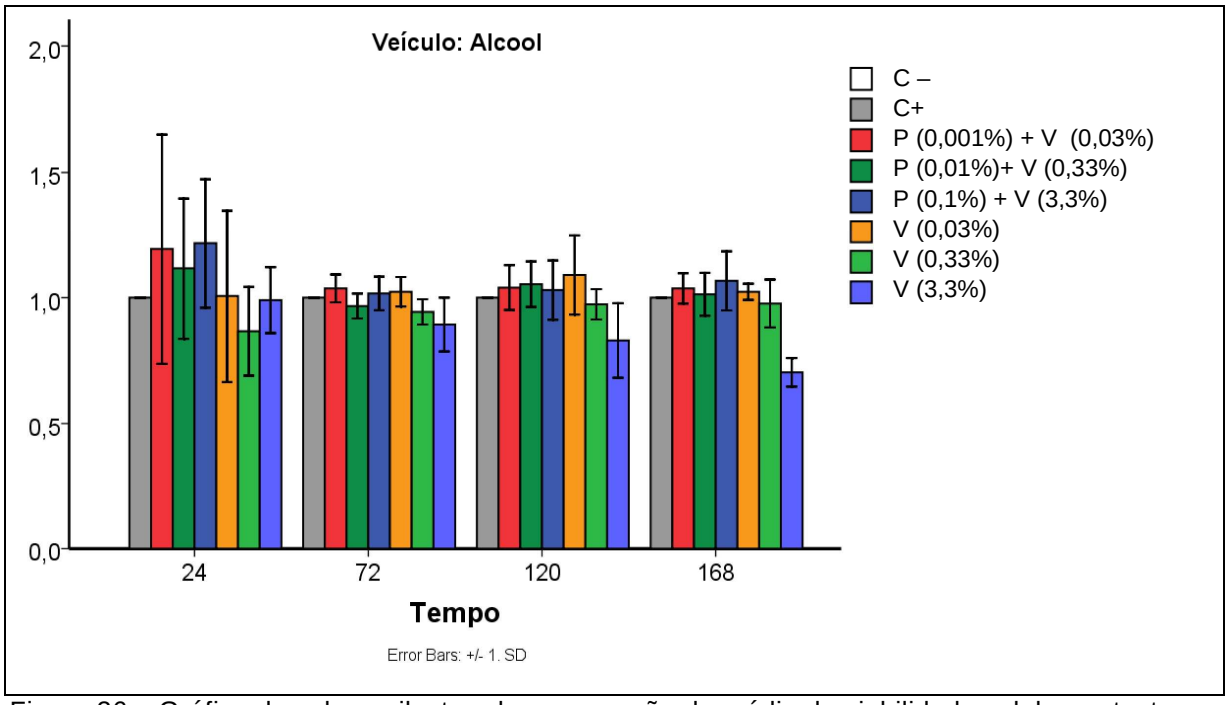


Figura 26 – Gráfico de colunas ilustrando a proporção da média da viabilidade celular no teste a longo prazo, nas soluções sem propilenoglicol (Placa Y).

Do mesmo modo, como as soluções com própolis apresentaram em geral, valores maiores que os controles positivos, pode-se afirmar também que a própolis nas concentrações do experimento, foi inócua aos fibroblastos da mucosa bucal e que até favoreceram uma ligeira proliferação, o que poderia contribuir clinicamente no reparo de tecidos lesionados. Quanto aos veículos, nas mesmas concentrações utilizadas com as soluções com própolis, apenas o veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol na concentração de 3,33% apresentou ligeira toxicidade, sendo que a média das 3 proliferações realizadas, houve aproximadamente 15% de morte celular e ao final do sétimo dia de contato com a solução, cerca de 30% das células haviam morrido (Apêndice P). Quando em mistura com a própolis, não houve tal situação, podendo sugerir que a própolis amenizou os danos provocados por este veículo.

6 DISCUSSÃO

A própolis tem sido usada durante séculos pela humanidade, mas só nos últimos quarenta anos é que tem aumentado o interesse científico por estudá-la (GHISALBERTI, 1979). As pesquisas com a própolis têm mostrado suas diversas propriedades, dentre elas:

Propriedades	Autores
Antimicrobiana	Ikeno *et al.* (1991); Amoros *et al.* (1992); Tosi *et al.* (1996); Kujumgiev *et al.* (1999); Martorell *et al.* (1999); Zárate-Pereira (1999); Koo *et al.* (2000); Murad *et al.* (2002); Zárate-Pereira (2003); Sonmez *et al.* (2005); Boyanova *et al.* (2006); Koru *et al.* (2007); Longhini *et al.* (2007); Najafi *et al.* (2007); Santos *et al.* (2008); Parma-Neto (2008).
Anticarcinogênica	Grunberger *et al.* (1988); Matsuno *et al.* (1997); Banskota *et al.* (1998); Banskota *et al.* (2000); Akao *et al.* (2003); Chen *et al.* (2004); Orsolic *et al.* (2005a); Orsolic *et al.* (2005b); Ozkul *et al.* (2005); Orsolic *et al.* (2006); Li *et al.* (2007); Najafi *et al.* (2007); Awale *et al.* (2008); Díaz-Carballo *et al.* (2008); Inoue *et al.* (2008); Li *et al.* (2008); Búfalo *et al.* (2009).
Antimutagênica	Tavares *et al.* (2006).
Antiinflamatória e cicatrizante	Azevedo *et al.* (1986); Magro-Filho e Perri de Carvalho (1990); Mendoza *et al.* (1991); Quintana Díaz (1992); Magro-Filho e Perri de Carvalho (1994); Quintana Díaz *et al.* (1997); Silva *et al.* (2000); Quintana Díaz *et al.* (2003); Rahal *et al.* (2003); Grégio *et al.* (2005); Sabir *et al.* (2005).
Antiúlcera	Cabarrocas e Gómez (1994); Lotufo *et al.* (2005); Barros *et al.* (2007); Lemos *et al.* (2007); Levya e Mesa (2007); Santos *et al.* (2007).
Analgésica e de aumento da resposta imune local	Silveira *et al*. (1988); Quintana Díaz (1996).

Figura 27 – Estudos sobre as propriedades da própolis.

A origem vegetal da própolis já foi estudada por alguns pesquisadores. Em nossa pesquisa, a origem da própolis, apesar de não comprovada quimicamente, sugere ser *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como Alecrim-do-campo ou Vassourinha, devido essas plantas estarem presentes na área da colméia de onde a própolis foi retirada e pela observação dos apicultores locais. Park *et al.* (2002), Paredes-Gusmán *et al.* (2003); Li *et al.* (2007); Funari *et al.* (2007) e Lemos *et al.* (2007) identificaram essa planta como sendo a principal origem da própolis originada no Sudeste do Brasil.

Centenas de compostos químicos já foram identificados na própolis por vários métodos:

Métodos químicos	Autores
CLAE	Park *et al.* (1997); Park *et al*. (2000b); Park *et al.* (2002); Paredes-Gusmán *et al.* (2003); Funari e Ferro (2006); Cuesta-Rubio *et al.* (2007); Funari *et al*. (2007); Lemos *et al.* (2007).
CG-EM	Bankova *et al*. (1998); Kujumgiev *et al*. (1999); Park *et al.* (2002); Ozkul *et al*. (2005); Mani *et al*. (2006); Koru *et al*. (2007); Búfalo *et al*. (2009).
CCDAE	Park *et al.* (1997); Park *et al*. (2000a); Park *et al*. (2000b); Park *et al.* (2002); Paredes-Gusmán *et al.* (2003); Búfalo *et al*. (2009).
RMN	Park *et al.* (2000b); Paredes-Gusmán *et al.* (2003); Albuquerque *et al.*, 2007; Cuesta-Rubio *et al.* (2007).

Figura 28 – Estudos sobre os métodos utilizados para análise da composição química da própolis.

De acordo com Pereira *et al*. (2002), a caracterização da qualidade da própolis brasileira é um desafio multidisciplinar que a comunidade científica tem pela frente, tendo em vista a variação de composição e o grande número de compostos bioativos. Na presente pesquisa, realizamos o fracionamento da própolis e identificamos 4 compostos químicos por RMN.

Após o fracionamento da fração hexânica e análise dos dados espectrais de RMN ^{1}H e ^{13}C, isolamos um triterpeno conhecido como lupeol. Este composto também foi encontrado por Albuquerque *et al.* (2007), em uma amostra de própolis proveniente do Ceará.

A fração acetato de etila nos permitiu identificar 3 substâncias, dentre elas um composto químico identificado foi o ácido 3,5 – diprenil – 4 – hidroxicinâmico, mais conhecido como Artepillin C, que segundo Paredes-Gusmán *et al.* (2003) e Paulino (2005), nos países asiáticos, principalmente no Japão, há intensa procura por própolis do Brasil que contenham este composto químico, e o mesmo já é utilizado nas transações para definir a qualidade do lote de própolis brasileira a ser exportado devido às suas propriedades biológicas. Essa substância também foi encontrada por Banskota *et al.* (1998), Paredes-Gusmán (2003), Funari e Ferro (2006), Barros *et al*. (2007), Funari *et al.* (2007), Lemos *et al.* (2007) e Li *et al.* (2007), ao examinarem a própolis provenientes de alguns estados do Brasil, inclusive Mato Grosso do Sul.

Segundo Paulino (2005), acredita-se que as principais atividades farmacológicas atribuídas à própolis brasileira estejam diretamente relacionadas com a presença de flavonóides e compostos fenólicos, especialmente o Artepillin C®, patenteado pela indústria farmacêutica japonesa (Hayashibara Pharmaceutica Co, Okayama, Japão). De acordo com o autor, essa substância tem recebido especial atenção por ser o componente majoritário presente nas amostras de

própolis brasileira e por apresentar importantes atividades biológicas, que em sua pesquisa foram similares àquelas demonstradas para o extrato de própolis.

Outro constituinte identificado na fração acetato de etila foi o 5,7 – diidroxi – 4' metoxiflavone, que por meio da comparação dos dados espectroscópicos obtidos com os registrados na literatura, permitiu a identificação desse flavonóide conhecido como acacetina. Park *et al.* (1997) também isolaram essa substância de amostras de própolis dos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, porém, não encontraram na proveniente do Mato Grosso do Sul. Albuquerque *et al.* (2007) também identificaram esse composto.

A última substância isolada na fração acetato de etila, foi um flavonóide identificado como sendo o 3,5,7 – trihidroxi – 4' metoxiflavanol, que também foi encontrado por Banskota *et al.* (1998) em amostras de própolis brasileira.

Quanto a citotoxicidade da própolis, esta já foi analisada *in vitro* anteriormente, porém, os estudos foram baseados principalmente na atividade dos extratos etanólicos, extratos aquosos ou seus componentes isolados em células cancerígenas, como nas pesquisas feitas por Grunberger *et al*. (1988); Matsuno *et al*. (1997); Banskota *et al*. (1998); Banskota *et al*. (2000); Park *et al.* (2000a); Akao *et al*. (2003); Chen *et al*. (2004); Lee *et al*. (2005); Orsolic *et al*. (2005b); Orsolic *et al*. (2006); Li *et al*. (2007); Najafi *et al*. (2007); Awale *et al*. (2008); Díaz-Carballo *et al*. (2008); Inoue *et al*. (2008); Li *et al*. (2008) e Búfalo *et al*. (2009). Algumas pesquisas de biocompatibilidade da própolis também foram realizadas com células normais dos tecidos, porém, observa-se na literatura um número muito superior de trabalhos que utilizam linhagens cancerígenas. Grunberger *et al*. (1988) realizaram testes com fibroblastos de embrião de rato Fischer; as células utilizadas por Lotufo (2003) foram fibroblastos de mucosa bucal humana; Al-Shaher *et al.* (2004) utilizaram fibroblastos da polpa e do ligamento periodontal de humanos; Lee *et al*. (2005), Somnez *et al*. (2005) e Özan *et al.* (2007) pesquisaram a biocompatibidade em fibroblastos gengivais humanos; Ozkul *et al*. (2005) realizaram testes em linfócitos periféricos humanos; Orsolic *et al*. (2006) usaram células epiteliais de bexiga humana; o trabalho de Najafi *et al*. (2007) foi com linfócitos humanos e células de rim, fígado e baço de rato e por fim, Funari *et al.* (2007) investigaram fibroblastos de camundongo.

Como foi visto, um grande número de autores realizaram testes *in vitro* utilizando diversas linhagens de células transformadas (cancerígenas) com o

objetivo de avaliar a toxicidade da própolis, porém, de acordo com Kavalco (1999), as linhagens de células transformadas diferem de várias formas, daquelas preparadas a partir de células normais. Por exemplo, as linhagens cancerígenas crescem sem se fixarem a uma superfície e proliferam-se em densidades muito altas em placas de cultura e, segundo Arenholt-Bindslev e Bleeg (1990), um crescente número de pesquisadores tem mostrado que testes de citotoxicidade *in vitro* podem ser mais convincentes quando são realizados utilizando-se células mais relevantes, por exemplo, aquelas que são homólogas aos tecidos humanos de maior interesse. Em nossa pesquisa, foram pesquisados os fibroblastos de mucosa bucal humana, pois são as células de tecidos normais da cavidade bucal, que podem ser influenciados pela solução de própolis testada, quando em tratamentos terapêuticos na cavidade bucal.

Pela revisão de literatura, pode-se constatar as diversidades de pesquisas clínicas com animais e humanos, utilizando a própolis para diferentes fins, como: cura de feridas bucais, reparo de diferentes lesões, tratamentos de processos inflamatórios, bochechos antimicrobianos, entre outros. Segundo Huang *et al*. (2002), existem várias maneiras que os materiais podem influenciar a saúde dos tecidos moles como pela interação com componentes da saliva e da cavidade oral ou pela interação direta com os tecidos adjacentes. Neste contexto, devido à própolis interagir com os tecidos bucais nos diversos tratamentos, é fundamental determinar sua biocompatibilidade.

A maior parte dos trabalhos publicados baseia-se na ação da própolis sem qualquer embasamento científico sobre suas propriedades citotóxicas. Uma vez que testes *in vivo* demonstraram resultados positivos para a mutagenicidade da própolis (PEREIRA *et al.*, 2008), e que existem relatos de estudos *in vitro* de citotoxicidade e mutagenicidade da mesma (BANSKOTA *et al.*, 1998; TAVARES *et al.*, 2006), é recomendável moderar seu uso e desenvolver testes de citotoxicidade/mutagenicidade para finalmente estabelecer as dosagens que poderiam representar risco para a saúde humana (PEREIRA *et al*., 2008).

Os testes de biocompatibilidade são essenciais na aceitação de qualquer material, juntamente com outros testes que avaliem suas propriedades. Em função do grande número de produtos lançados no mercado e, por conseguinte, a serem avaliados, torna-se necessário aprimorar as metodologias e selecionar aquelas mais fidedignas quanto à presença de possíveis elementos tóxicos (HANKS *et al.*, 1996).

As células escolhidas para utilização neste experimento foram os fibroblastos, que de acordo com Martins *et al.* (2009), são as principais células responsáveis pelo reparo tecidual em quadro de inflamação tecidual. Além disso, optamos pelos fibroblastos de mucosa bucal humana, pois esses locais da boca são muito susceptíveis a lesões ulcerativas que necessitam de intervenção terapêutica como medicações antiinflamatórias, cicatrizantes e analgésicas, características estas atribuídas à própolis.

Neste estudo, avaliamos a citotoxicidade, em cultura de fibroblastos de mucosa bucal humana, de um extrato etanólico de própolis, em diferentes concentrações e veículos. Buscou-se, com esta análise, fornecer informações a respeito do comportamento das células, em contato com os extratos para que estes possam, posteriormente, serem utilizados em estudos *in vivo*. Utilizamos a linhagem de fibroblastos FLM, cedidos pelo laboratório de Bioodontologia da Universidade Ibirapuera, obtidos a partir de culturas secundárias, uma vez que representam células provenientes de culturas primárias que foram removidas diretamente de tecidos de um organismo (KAVALCO, 1999).

Apesar de encontrarmos poucos estudos sobre citotoxicidade em cultivo de fibroblastos de extratos de própolis na literatura, vários trabalhos clínicos demonstram sua eficácia. A maior parte desses trabalhos refere à ação da própolis de diferentes regiões do Brasil e do mundo, porém, existem poucos estudos clínicos e nenhum sobre a citotoxicidade da própolis originária do Mato Grosso do Sul.

Para simular *in vitro* condições análogas aos tecidos lesionados, que ocorrem frequentemente na cavidade bucal, privamos parcialmente as células de nutrientes, isso quer dizer que no momento do experimento com as soluções-teste, o cultivo foi feito em DMEM com quantidade insatisfatória de fatores de crescimento. Esse *déficit* nutricional foi obtido pela diminuição na concentração de soro fetal bovino nos meios de cultura de 10% para 5%. Com isso, simulamos em parte, uma situação de estresse das células semelhante ao que ocorre *in vivo* com os fibroblastos do tecido conjuntivo sem a proteção do tecido epitelial, ficando sujeito a diversas injúrias. Esse trabalho foi semelhante ao realizado por Lotufo (2003).

Os veículos escolhidos para preparar as soluções de própolis utilizada na pesquisa, foram: solução hidroalcoólica com propilenoglicol e sem propilenoglicol. A porcentagem de cada um desses componentes foi semelhante ao realizado por Lotufo (2003) e Özan *et al.* (2007). A maior parte dos trabalhos clínicos e com

culturas celulares, realizados com a própolis, utilizam água e etanol como veículos principais. O propilenoglicol também foi utilizado em algumas pesquisas (SILVEIRA *et al.*, 1988; QUINTANA DÍAZ, 1996; LOTUFO, 2003; LOTUFO *et al.*, 2005; SONMEZ *et al.*, 2005; ÖZAN *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008). No nosso trabalho, escolhemos o propilenoglicol, pois o mesmo é muito usado em diversas preparações farmacêuticas. Apesar da baixa concentração utilizada (5%), a pretensão foi avaliar se o mesmo acarretaria alguma diferença na viabilidade celular.

Segundo Marcucci (1995; 1996), o etanol é o solvente mais comumente utilizado para preparações de extratos de própolis, e outros solventes tais como éter-etílico, água, metanol, éter-petróleo e clorofórmio são usados para extração e identificação de muitos compostos da própolis. Além destes, glicerina, propilenoglicol e algumas soluções oleosas têm sido usadas nas preparações à base de própolis pela indústria farmacêutica e cosmética (TOSI *et al.*, 1996). Segundo Lotufo (2003), o propilenoglicol proporciona a obtenção de uma solução menos viscosa que o EEP, facilitando a aplicação clínica devido a sua consistência. De acordo com Longhini *et al.* (2007), o propilenoglicol é utilizado amplamente no mercado farmacêutico, por serem menos agressivos do que o álcool à pele e mucosas e propiciarem formas farmacêuticas emulsionadas mais estáveis.

Pela revisão de literatura, constatamos que a maioria dos trabalhos com a própolis utiliza uma metodologia própria. Muitas pesquisas não descrevem a porcentagem das substâncias utilizadas para a elaboração da solução testada. A partir desse contexto, torna-se difícil fazer análises comparativas dos resultados e padronizar a amostra experimental.

É importante notar que as células utilizadas em testes com cultura celular são mais sensíveis aos efeitos tóxicos das drogas, pois as substâncias a serem testadas irão interagir diretamente com as mesmas em monocamada, sem haver interação com o organismo (CIAPETTI *et al.*, 1996; MARTINS *et al.*, 2009). Nos estudos *in vivo*, além de outras células estarem presentes (neutrófilos, vasos sanguíneos e linfáticos), na mucosa bucal, os fibroblastos não estão em monocamada, e sim, em várias camadas no tecido conjuntivo.

Segundo Koulaouzidou *et al.* (1999), embora os resultados dos testes que avaliam a citotoxicidade *in vitro* possam não ter uma correlação direta com os *in vivo*, é seguro afirmar que, se um material induz, comprovadamente, uma reação

citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é muito provável que desenvolva efeitos tóxicos quando aplicado em tecido vivo.

Para avaliar a citotoxicidade das soluções hidroalcoólicas de própolis com e sem propilenoglicol, realizamos experimentos de curto e longo prazo. Nos testes de viabilidade celular em curto prazo, foram testadas 5 concentrações (1%, 0,5%, 0,1%, 0,01% e 0,001%) das soluções de própolis e dos respectivos veículos na mesma concentração quando em solução. As concentrações das soluções e dos veículos foram obtidos por diluições seriadas, a partir da solução estoque de própolis (3%) ou dos veículos, em DMEM 5% SBF, no momento da realização do experimento. Essas concentrações foram escolhidas para pré-análise do efeito citotóxico, em curto prazo, para posteriormente, realizarmos testes de longo prazo. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração, e a citotoxicidade *in vitro* das substâncias em cultura de fibroblastos foram comparadas ao grupo controle, no qual estava presente somente DMEM 5% SBF em contato com as células.

Para quantificação da proporção de células viáveis, em ambos os testes, curto e longo prazo, foi utilizado o teste do resazurin. Este teste começou a ser usado há aproximadamente 50 anos para avaliar a contaminação bacteriana do leite e qualidade do sêmen e tem sido comercializado desde 1993, como Alamar Blue® (O'BRIEN *et al*., 2001). A avaliação da citotoxicidade usando esse método já foi utilizada em diversas linhagens celulares, por exemplo: fibroblastos (VOYTIK-HARBIN *et al.*, 1998), células endoteliais de córnea de coelhos (LARSON *et al.*, 1997), células de córnea de porco (PERROT *et al.*, 2003), linfócitos humanos e de camundongos (AHMED *et al.*, 1994), linhagens de células de câncer (NAKAYAMA *et al*., 1997).

Segundo Mossman (1983), os testes colorimétricos, como o do resazurin ou MTT, compartilha com o teste radioisótopo a vantagem da quantificação precisa da viabilidade celular e compatibilidade com programa de análise em computadores. Este representa um teste de leitura rápida e grandes quantidades de dados podem ser gerados.

Shimazawa *et al.* (2005) também avaliaram a sobrevivência celular (cultura celular PC 12) após utilização de extratos de própolis verde por meio da mudança na intensidade fluorescente, resultante da redução do resazurin a resofurina. A viabilidade celular foi avaliada após imersão da solução de resazurin a 10% no meio

celular por 3 horas a 37ºC, e a fluorescência foi registrada a 560/590nm. Essa metodologia de leitura foi semelhante à utilizada em nossa pesquisa.

Na viabilidade celular a curto prazo, foi encontrado que nas concentrações de 0,5%, a solução hidroalcoólica de própolis com propilenoglicol e sem propilenoglicol, 47% das células permaneceram viáveis. Na análise dos veículos, no veículo hidroalcoólico com propilenoglicol e sem propilenoglicol, 51% e 79% das células permaneceram viáveis, respectivamente. Ou seja, na concentração de 0,5%, a única solução que causou mínima toxicidade, foi o veículo hidroalcoólico sem propilenoglicol. Na concentração de 1%, os resultados foram piores, visto que causaram maior proporção de morte celular (Tabela 1). Nas concentrações de 0,1%, 0,01% e 0,001%, todas as soluções e respectivos veículos causaram pouca ou nenhuma morte celular, com mais de 90% de viabilidade celular. A partir desses resultados, pode-se afirmar que pelo teste de curto prazo, as concentrações de 0,5% e 1% foram tóxicas aos fibroblastos da mucosa bucal. Como as outras concentrações apresentaram resultados favoráveis a curto prazo, decidimos realizar testes de longo prazo, para confirmar e analisar mais detalhadamente por um maior período essa situação.

Na segunda avaliação, analisamos o cruzamento dos quatro fatores envolvidos na pesquisa, que foram: tempo experimental (1, 3, 5 e 7 dias), proliferação (1ª, 2ª e 3ª), veículo (com propilenoglicol e sem propilenoglicol) e soluções experimentais.

A obtenção da proporção de células viáveis, comparados aos controles positivo e negativo, nos indicou que apenas duas soluções das 12 testadas, apresentaram algum grau de toxicidade contra os fibroblastos da mucosa jugal.

Na concentração da solução hidroalcoólica de própolis 0,001% com e sem propilenoglicol e seus respectivos veículos em iguais concentrações, os resultados amostrais foram semelhantes ou até mesmo superiores aos das culturas controles, mostrando que essas soluções, nessa concentração, foram inócuas aos fibroblastos FLM. Lotufo (2003) realizou uma pesquisa com a própolis do tipo 12, porém, utilizou apenas solução hidroalcoólica com propilenoglicol, nas mesmas concentrações utilizadas no presente estudo e também encontrou que a proliferação celular foi semelhante às culturas controle nessa concentração.

Na concentração das soluções pesquisadas a 0,01%, algumas apresentaram proporções de células ligeiramente inferiores às soluções controles, porém, foram

insignificantes estatisticamente. Essas soluções, nessa concentração, também mostraram o aspecto biocompatível com as células em questão. O trabalho de Lotufo (2003) mostrou que nessa concentração, as células proliferaram do primeiro ao quinto dia, porém, a partir do quinto dia, houve diferença estatisticamente significante com o controle. Apesar disso, as soluções testadas foram biocompatíveis.

Na concentração das soluções do nosso estudo a 0,1%, as soluções com a presença de própolis, mantiveram a viabilidade das células, ligeiramente superior às soluções controles, porém, os respectivos veículos, nessa concentração, causaram ligeira citotoxicidade na amostra observada. Nossos resultados foram um pouco diferentes dos encontrados por Lotufo (2003), pois nessa concentração, após o terceiro dia, tanto na solução com a própolis, quanto no veículo isolado, ocorreu uma diminuição progressiva do número de células, bem inferior à solução controle. Segundo a autora, essa concentração é a que mais se aproxima da indicação para uso clínico.

Como os trabalhos realizados para avaliar a citotoxicidade de extratos de própolis ou de alguns de seus constituintes utilizaram linhagens celulares e metodologias diferentes da nossa pesquisa, tornou-se difícil comparar diretamente os resultados. Al-Shaher *et al.* (2004), Lee *et al.* (2005), Sonmez *et al.* (2005) e Funari *et al.* (2007), ao utilizarem diferentes concentrações de própolis, observaram que houve morte celular diretamente proporcional ao aumento da concentração. Já nas pesquisas realizadas por Orsolic *et al.* (2006) e Najafi *et al.* (2007), as concentrações utilizadas pelos autores não foram tóxicas às células epiteliais de bexiga e linfócitos, respectivamente analisados.

Özan *et al.* (2007) realizaram uma pesquisa com própolis em um veículo semelhante ao da nossa pesquisa, porém, encontraram que as soluções hidroalcoólicas de própolis com propilenoglicol nas concentrações de 1,0%; 2,5% e 5,0% não foram citotóxicas aos fibroblastos gengivais pelo teste de difusão em agar, apresentando ligeira citotoxicidade quando utilizada a 10%. Resultados estes bem diferentes dos apresentados na presente pesquisa, visto que a concentração a 0,5% causou mais de 50% de morte dos fibroblastos.

Em nosso trabalho, na análise dos períodos experimentais (1, 3, 5 e 7 dias) das soluções com propilenoglicol, identificamos que houve morte celular estatisticamente significativa do 1º para o 7º dia. O percentual de células viáveis do

primeiro para o sétimo dia caiu em 13,71%. Já nas soluções sem propilenoglicol, não foi constatada diferenças significativas entre os tempos na análise de variância ANOVA e confirmado pelo teste de Tukey.

A partir do fato anterior, podemos sugerir que o propilenoglicol apresentou efeitos indesejáveis no teste de citotoxicidade a longo prazo, pois causou maior porcentagem de morte celular nos períodos experimentais mais tardios.

Segundo Lotufo (2003), apesar dos dados obtidos com a metodologia *in vitro* do cultivo celular não poderem ser aplicados diretamente no indivíduo *in vivo*, essas pesquisas apontam caminhos para o uso da própolis na terapêutica em lesões bucais, como por exemplo, em úlceras aftosas recorrentes.

Os nossos resultados são promissores na indicação do uso da própolis no tratamento de diversas afecções bucais, visto que não agrediu os fibroblastos em baixas concentrações, porém, deve ser utilizado com cautela, uma vez que concentrações acima de 0,5% causaram mais de 50% de morte celular, como indicado pelos resultados do teste de curto prazo, realizado nesta pesquisa.

Este estudo serve de subsídio para futuras investigações no desenvolvimento de produtos tópicos que, após estudos *in vivo*, poderão ser utilizados, com segurança, no tratamento de lesões inflamatórias da cavidade bucal e de outros tecidos. Tendo em vista que a boca é sede de inúmeras doenças que se manifestam como úlceras sintomáticas, algumas crônicas e recorrentes, um produto natural com ação antiinflamatória e cicatrizante torna-se excelente auxiliar terapêutico dessas lesões.

7 CONCLUSÕES

a) A análise química da própolis verde proveniente do Estado do Mato Grosso do Sul, permitiu identificar quatro substâncias químicas: lupeol, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C®), 5,7-diidroxi-4'-metoxiflavone (acacetina) e 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavonol;

b) A análise da citotoxicidade a curto prazo foi depende da concentração utilizada e permitiu concluir que:

- As soluções com própolis a 0,5% e 1% foram citotóxicas aos fibroblastos, com mais de 50% de morte celular;
- As soluções e os veículos a 0,001%, 0,01% e 0,1% foram biocompatíveis;

c) A análise da citotoxicidade a longo prazo a 0,001%, 0,01% e 0,1% determinou que:

- As soluções de própolis com propilenoglicol, nestas concentrações, não foram citotóxicas, portanto biocompatíveis aos fibroblastos, porém, houve significativa morte celular após 7 dias;
- As soluções de própolis sem propilenoglicol foram biocompatíveis *in vitro*, não apresentando significativa morte celular com o passar do tempo;

REFERÊNCIAS[1]

Abreu EG, Estrada EC, López AR, Illance MP. Actividad anticaries de uma crema dental com propóleos. Rev. Cub Estomatol. 2000; 37(3):166-70.

Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [H]thymidine incorporation assay. J. Imunol Methods. 1994; 170(2):211-24.

Akao Y, Maruyama H, Matsumoto K, Ohguchi K, Nishizawa K, Sakamoto T, et al. Cell growyh inhibitory effect of cinnamic acid derivates from propolis on human tumor cell lines. Biol. Pharm. Bull. 2003; 26(7):1057-9.

Albuquerque IL, Leonardo AAT, Telma LGL, Francisco JQM. Ácido canárico (3,4-seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. Química Nova**.** 2007; 30(4):828-31.

Al-Shaher A, Walace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. J Endodon. 2004; 30(5):359-61.

Amoros M, Simões CMO, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. J. Nat. Prod. 1992; 55(12):1732-40.

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

Arenholt-Bindslev D, Bleeg H. Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. Int Endodon J. 1990; 23(2):84-91.

Azevedo IBS, Sampaio RF, Montes JC, Contreras RLL. Tratamento das escaras de decúbito com própolis. Rev. Bras. Enf. 1986; 39(2/3):33-7.

Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tesuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. Bioorg. Med. Chem. 2008; 16:181-9.

Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Popov S, Sforcin JM, Funari SRC. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. Apidologie. 1998; 29:361-7.

Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol. 2005; 100:114-7.

Banskota AH, Tezuka Y, Prasain JK, Matsushige K, Saiki I, Kadota S. Chemical constituints of brazilian propolis and their cytotoxic activities. J. Nat. Prod. 1998; 61:896-900.

Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Two novel cytotoxic benzofuran derivates from Brazilian propolis. J. Nat. Prod. 2000; 63:1277-9.

Barros MP, Sousa JP, Bastos JK, Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. J Ethnopharmacol. 2007; 110:567-71.

Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JPB, Bastos JK, et al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. J Ethnopharmacol. 2008; 120:372-7.

Boyanova L, Kolarov R, Gergova G, Mitov I. In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical iisolates of anaerobic bacteria . Anaerobe. 2006; 12:173-7.

Brailo V, Boras VV, Alajbeg I, Juras V. Delayed contact sensitivity on the lips and oral mucosa due to propolis - case report. Oral Medicine and Pathology. 2006; 11:303-4.

Búfalo MC, Candeias JMG, Sforcin JM. *In vitro* effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (Hep-2) cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2009; 6(4):483-7.

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

Cabarrocas FV, Gómez EH. Efectividad del propóleos en el tratamiento de la estomatitis aftosa. Medicentro. 1994; 10(1):49-58.

Camps IB, Simón GG, Suárez EM, Hernández KD. Evaluación de la irritabilidad dérmica, oftálmica e el efecto sensibilizante de la crema ulceprol. Anuario Toxicologia. 2001; 1(1):93-7.

Chen CN, Weng MS, Wu CL, Lin JK. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. Evid Based Complement Alternat Med. 2004; 1(2):175-85.

Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. Application of a combination of nutral red anda mino black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. Biomaterials. 1996; 17(13):1259-64.

Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC, Hernández IM, Rosado A, Rastrelli L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the b*rown*, r*ed*, and *yellow* Cuban varieties of propolis. J. Agric. Food Chem. 2007; 55:7502-9.

Díaz-Carballo D, Freistühler M, Malak S, Bardenheuer W, Reusch HP. Mucronulatol from Caribbean propolis exerts cytotoxic effects on human tumon cell lines. Int. J Clin Pharmacol Ther. 2008; 46(5):226-35.

Elgezua OL, Gorrotxategi PE, Azkarate AS, Nieto JAR, Díaz-Pérez. Dermatitis alérgica de contacto por propóleo. Med Cutan Iber Lat Am. 2004; 33(3):117-9.

Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH, Nelson J. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. Arch Oral Biol. 1985; 30(8):609-13.

Fernández SG, Luaces EL, Madoz SE, Alemán EA, Apiñániz MA, Purroy AIT. Allergic contact stomatitis due to therapeutic própolis. Contact dermatitis. 2004; 50:321.

Freshney RI. Biology of the cultured cell: a manual of basic technique. 2 ed. New York: Wisley Liss; 1990. p. 347.

Funari CS, Ferro VO. Análise de própolis. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2006; 26(1):171-8.

Funari CS, Ferro VO, Mathor MB. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. J Ethnopharmacol. 2007; 111:206-12.

Ghisalberti EL. Propolis: a review. Bee World. 1979; 60(2):59-84.

Giusti F, Miglietta R, Pepe P, Seidenari S. Sensibilization to propolis in 1255 children undergoing patch testing. Contact Dermatitis. 2004; 51:255-8.

Grégio AMT, Lima AAS, Ribas MO, Barbosa APM, Pereira ACP, Koike F, et al. Efeito da própolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. Estud. Biolog. 2005; 27(58):43-7.

Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, et al. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. Experientia. 1988; 44(3):230-2.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. Dent Mater. 1996; 12:186-93.

Harrison RG. Observations on the living developing nerv fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1907; 4:140-3.

Huang TH, Tsai CY, Chen SL, Kao CT. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer-cell line. J. Biomed. Mat. Res. 2002; 63(6):814-21.

Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res. 1991; 25:347-51.

Inoue K, Saito M, Kanai T, Kawata T, Shigematsu N, Uno T, et al. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line *in vivo* and *in vitro*. The Amer Journ of Chin Med. 2008; 36(3):625-34.

Kavalco K. Cultura de células. [homepage na internet]. 1999. [acesso em 02 de maio de 2010]. Disponível em: http://biociencia.org/index.php

Kettering JD, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. Int Endod J. 1984; 17(2):60-6.

Kiderman A, Torten R, Furst AL, Reinus K. Bi-lateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis. Journal of Dermatological Treatment. 2001; 12:29-31.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of própolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000; 45:141-8.

Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Guclu AU, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe. 2007; 13(3-4):140-5.

Koulaouzidou EA, Margelos J, Beltes P, Kortsaris AH. Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solutions used as root canal irrigants. J. Endod. 1999; 25(1):21-3.

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

Larson EM, Doughman DJ, Gregerson DS, Obritsch WF. A new, simple, nonradioactive, nontoxic in vitro assay to monitor corneal endothelial cell viability. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1997; 38(10):1929-33.

Lee YT, Don MJ, Hung OS, Shen YC, Lo YS, Chang KW, et al. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. Cancer Letters. 2005; 223:19-25.

Lemos M, Barros MP, Sousa JPB, Silva Filho AA, Bastos JK, Andrade SF. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiucer activity. J Pharm Pharmacol. 2007; 59(4):603-8.

Levya SB, Mesa XMC. Efectividad del uso del propóleo em el tratamiento de la estomatite aftosa. Rev. Cub Estomatol. 2007; 44(3). [acesso em 19 de novembro de 2009]. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script

Li H, Kapur A, Yang JX, Srivastava S, McLeod DG, Paredes-Gusman JF, et al. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. Int J Oncol. 2007; 31:601-6.

Li F, Awale S, Tezuka Y, Kadota S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their struture-activity relationship. Bioorg. Med. Chem. 2008; 16:5434-40.

Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Rev. Bras. Farmacogn. 2007; 17(3):388-95.

Lotufo M. Análise da citotoxicidade *in vitro* da solução de própolis em propilenoglicol [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2003.

Lotufo MA, Lemos Júnior CA, Shimizu MT, Cabral R, Birman EG. Clinical evaluation of the topical use of propolis in recurrent minor aphthous ulceration. Cienc Odontol Bras. 2005; 8(3):6-9.

McDonald C. Development of new cell lines for animal cell biotechnology. Crit. Rev. Biotechnol. 1990; 10(2):155-78.

McLennan SV, Bonner J, Milne S, Lo L, Charlton A, Kurup S, et al. The anti-inflammatory agent propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. Wound Rep Reg. 2008; 16:706-13.

Magro Filho O, Perri de Carvalho AC. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. J. Nihom Univ. Sch. Dent. 1990; 32:4-13.

Magro-Filho O, Perri de Carvalho AC. Topical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. J. Nihon Univ. Sch. Dent. 1994; 36(2):102-11.

Mani F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. J Ethnopharmacol. 2006; 105:95-8.

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. Química Nova. 1996; 19(5):529-35.

Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Mesquita-Ferrari RA, Pavesi VCS, Wadt NS, et al. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). ConScientiae Saúde. 2009; 80(1):99-104.

Martorell SG, González CR, García CRH, Estevez OPC, Pérez BD. Acción antibacteriana de la tintura hidroalcohólica de propóleos al 4% em gérmenes de origen endodóncio. Arch. Méd. Camaguey. 1999; 3(4):39-44.

Matsuno T, Matsumoto Y, Saito M, Morikawa J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. Z Naturforsch. 1997; 52(9-10):702-4.

Mendoza OH, Pérez JA, Ramos CL, Arioza MC. Propoleo y ulceras flebostaticas. Rev Cubana Cir. 1991; 30(1):28-33.

Moreira TF. Composição química do própolis: vitaminas e aminoácidos. Rev Bras Farmacogn. 1986; 1(1):12-9.

Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth. 1983; 65(1-2):55-63.

Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC, Bankova V, Sforcin JM. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioies brasiliensis*. J Ethnopharmacol. 2002; 79:331-4.

Najafi MF, Vahedy F, Seyyedin M, Jomehzadeh HR, Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. Cytotechnology. 2007; 54:49-56.

Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. J Immunol Methods. 1997; 204:205-8.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Eur. J. Biochem. 2000; 267:5421-6.

Orsolic N, Kosalec I, Basic I. Synergystic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich Ascites tumour. Biol. Pharm. Bull. 2005a; 28(4):694-700.

Orsolic N, Terzic S, Mihaljevic Z, Sver L, Basic I. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. Biol. Pharm. Bull. 2005b; 28(10):1928-33.

Orsolic N, Stajcar D, Basic I. Cytotoxicity of propolis and its polyphenolic compounds on primary culture of human urinary bladder transitional cell carcinoma. Pharmacologyonline. 2006; 3:408-15. [acesso em 29 de março de 2010]. Disponível em: http://www.pharmacologyonline.unisa.it/archivies.php

Özan F, Sümer Z, Polat ZA, Er K, Özan Ü, Deger O. Effect of mouthrinse containing propolis on oral microorganisms and human gingival fibroblasts. Eur J Dent. 2007; 1:195-201.

Ozkul Y, Silici S, Eroglu E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. Phytomedicine. 2005; 12:742-7.

Paredes-Guzmán J, Aguiar CL, Fujiwara F, Park YK. Estudo da própolis que contém Artepillin C. Mensagem Doce. 2003; 74:2-5. [acesso em 27 de abril de 2010]. Disponível em: http://www.apacame.org.br/mensagemdoce

Parma Neto A. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos hidroalcóolicos de própolis de *Apis mellifera* sobre biofilme e cepas periodontopatogênicas [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal do Mato Grosso do Sul; 2008.

Park YK, Koo MH, Ikegaki M, Contado JL. Comparison of the flavonoid aglycone contents of Apis mellifera propolis from various regions of Brazil. Arq. Biol. Tecnol. 1997; 40(1):97-106.

Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Wang HK, Bastow K, Cosentino M et al. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. Mensagem Doce. 2000a; 56:2-5. [acesso em 27 de abril de 2010]. Disponível em http://www.apacame.org.br/mensagemdoce

Park YK, Ikegaki M, Alencar SM. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. Mensagem Doce. 2000b; 58:2-10. [acesso em 27 de abril de 2010]. Disponível em: http://www.apacame.org.br/mensagemdoce

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

Paulino N. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, Artepillin C® [Dissertação]. Florianópolis; Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.

Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. Química Nova. 2002; 25(2):321-6.

Pereira AD, Andrade SF, Swerts MSO, Maistro EL. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. Food Chem Toxicol. 2008; 46:2580-4.

Pérez Capote MR, Rodriguez Torres CC, Leon Fernández OS, Rodriguez SS, Alvarez D, Castañeda J, et al. Evaluacion toxicológica de uma tintura de propóleos. Acta Farm. Bonaerense. 2003; 22(1):61-4.

Perrot S, Dutertre-Catella H, Martin C, Rat P, Warnet JM. Resazurin metabolism assay is a new sensitive alternative test in isolated pig cornea. Toxicol Sciences. 2003; 72:122-9.

Polo EC, Silva-Filho LC, Silva GVJ, Constantino MG. Síntese de 1-indanonas através da reação de acilação de friedel-crafts intramolecular utilizando $NbCl_5$ como ácido de Lewis. Quim. Nova. 2008; 31(4):763-6.

Quintana Díaz JC. El uso de la propolina al 8% em el tratamiento de la alveolitis. Estúdio preliminar. Rev. Cub Estomatol. 1992; 29(2):93-7.

Quintana Díaz JC. Efectos del propóleos en los tratamientos quirúrgicos y lãs úlceras bucales. Rev. Cub Estomatol. 1996; 33(1):26-9.

Quintana Díaz JC, Rodríguez OA, Velásquez MD, Milián ML. Empleo de la tintura de propóleo al 5% em la cura de heridas sépticas faciales. Rev. Cub Estomatol. 1997; 34(1):25-7.

Quintana Díaz JC, Campos LA, Fregio MJF. Empleo de la crema de propóleos al 5% em afecciones bucofaciales. Rev Haban Cienc Méd. 2003; 9(2):17-21.

Rahal SC, Bracarense APFRL, Tanaka CY, Grillo TP, Leite CAL. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. Arch Vet Sci. 2003; 8(1):61-7.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. Mat. Res. 2003; 6(3):317-20.

Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. J Oral Sci. 2005; 47(3):135-8.

Samet N, Laurent C, Susarla SM, Samet-Rubinsteen N. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. Clin Oral Invest. 2007; 11:143-7.

Santos VR. Própolis: antibiótico natural alternativo e m Odontologia? (Revisão de literatura). Revista do CROMG. 1999; 5(3):192-5.

Santos MJ, Vianna LAC, Gambá MA. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. Acta Paul Enferm. 2007; 20(2):199-204.

Santos VR, Gomes RT, Mesquita RA, Moura MDG, França EC, Aguiar EG, et al. Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. Phytother. Res. 2008; 22:1544-7.

Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. J Dent. 1994; 22(2):6-11.

Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. J Ethnopharmacol. 2007; 113:1-14.

Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, Nagai H, Hara H. Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. Evid Based Complement Alternat Med. 2005; 2(2):201-7.

Siddiqui S, Hafeez F, Begum S, Seddiqui BS. J. Nat. Products. 1988; 51: 229–32.

Silva EB, Silva FB, Franco SL, Ramalho LTO, Peruchi CMS. Efeito da ação da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos. Estudo histológico. Robrac. 2000; 9(28):4-8.

Silva FB, Almeida JM, Sousa SMG. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflamatory action. Braz Oral Res. 2004; 18(2):174-9.

Silveira GM, Godoy AG, Torriente RO, Ortiz MCP, Cuéllar MAF. Estúdio preliminar sobre los efectos del propolan em el tratamiento de la gengivitis cronica y de las ulceras bucales. Rev. Cub Estomatol. 1988; 25(3):36-44.

Silveira GM, González EA, Delgado LO, Godoy AG. Efectos curativos de uma solucion hidroalcoholica del propoleos cubano al 1,5% em la terapeutica periodontal. Rev. Cub Estomatol. 1992; 29(1):14-9.

Simões CC, Araújo DB, Araújo RPC. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. Rev. Bras. Farmacogn. 2008; 18(1):84-9.

Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. J Ethnopharmacol. 2005; 102:371-6.

Tavares DC, Barcelos GRM, Silva LF, Tonin CCC, Bastos JK. Própolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. Toxicology in vitro. 2006; 20:1154-8.

Tosi B, Donini A, Romagnoli C, Bruni A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. Phytoth. Res. 1996; 10:335-6.

Valadares MC. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL_{50}”. Revista Eletrônica de Farmácia. 2006; 3(2):93-98. [acesso em 16 de junho de 2010]. Disponível em: http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/issue/view/343

Van Wyk CW, Olivier A, Maritz JS. Cultered pulp fibroblasts: are they suitable for *in vitro* cytotoxicity testing? J Oral Pathol Med. 2001; 30:168-77.

Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Waisner B, Lamar CH, Badylak SF. Application and evaluation of the Alamarblue assay for cell growth and survival of fibroblasts. In vitro cell. Dev. Biol. Animal. 1998; 34:239-46.

Zárate-Pereira P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%; fluoreto de sódio 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05%, sobre níveis de estreptococos do grupo mutans em pacientes cárie-ativos [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

Zárate-Pereira P. Estudo *in situ* sobre a ação da própolis de *Apis mellifera* no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental [Tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Watts A, Paterson RC. ‘Usage’ testing of root canal sealing materials – a personal view. J. Dent. 1992; 20(5):266-71.

APÊNDICE A

P 0,001% + V/PG 0,03%	P 0,001% + V/PG 0,03%	P 0,001% + V/PG 0,03%	V/PG 0,03%	V/PG 0,03%	V/PG 0,03%	P 0,001% + V 0,03%	P 0,001% + V 0,03%	P 0,001% + V 0,03%	V 0,03%	V 0,03%	V 0,03%
P 0,01% + V/PG 0,33%	P 0,01% + V/PG 0,33%	P 0,01% + V/PG 0,33%	V/PG 0,33%	V/PG 0,33%	V/PG 0,33%	P 0,01% + V 0,33%	P 0,01% + V 0,33%	P 0,01% + V 0,33%	V 0,33%	V 0,33%	V 0,33%
P 0,1% + V/PG 3,33%	P 0,1% + V/PG 3,33%	P 0,1% + V/PG 3,33%	V/PG 3,33%	V/PG 3,33%	V/PG 3,33%	P 0,1% + V 3,33%	P 0,1% + V 3,33%	P 0,1% + V 3,33%	V 3,33%	V 3,33%	V 3,33%
P 0,5% + V/PG 16,5%	P 0,5% + V/PG 16,5%	P 0,5% + V/PG 16,5%	V/PG 16,5%	V/PG 16,5%	V/PG 16,5%	P 0,5% + V 16,5%	P 0,5% + V 16,5%	P 0,5% + V 16,5%	V 16,5%	V 16,5%	V 16,5%
P 1% + V/PG 33%	P 1% + V/PG 33%	P 1% + V/PG 33%	V/PG 33%	V/PG 33%	V/PG 33%	P 1% + V 33%	P 1% + V 33%	P 1% + V 33%	V 33%	V 33%	V 33%
DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM
C +	C +	C +									
C -	C -	C -									

Figura 1 - Desenho esquemático de uma placa com 96 poços para teste de viabilidade celular a curto prazo.

APÊNDICE B

P 0,001% + V/PG 0,03%	P 0,001% + V/PG 0,03%	P 0,001% + V/PG 0,03%	V/PG 0,03%	V/PG 0,03%	V/PG 0,03%
P 0,01% + V/PG 0,33%	P 0,01% + V/PG 0,33%	P 0,01% + V/PG 0,33%	V/PG 0,33%	V/PG 0,33%	V/PG 0,33%
P 0,1%+ V/PG 3,33%	P 0,1%+ V/PG 3,33%	P 0,1%+ V/PG 3,33%	V/PG 3,33 %	V/PG 3,33 %	V/PG 3,33 %
C+	C+	C+	C-	C-	C-

Figura 2 - Desenho Esquemático da placa com 24 poços – Soluções com propilenogicol – “Placa X” (Teste de sobrevivência celular a longo prazo).

P 0,001% + V 0,03%	P 0,001% + V 0,03%	P 0,001% + V 0,03%	V 0,03%	V 0,03%	V 0,03%
P 0,01% + V 0,33%	P 0,01% + V 0,33%	P 0,01% + V 0,33%	V 0,33%	V 0,33%	V 0,33%
P 0,1%+ V 3,33%	P 0,1%+ V 3,33%	P 0,1%+ V 3,33%	V 3,33 %	V 3,33 %	V 3,33 %
C+	C+	C+	C-	C-	C-

Figura 3 - Desenho esquemático da Placa com 24 poços – Soluções sem propilenoglicol – “Placa Y” (Teste de sobrevivência celular a longo prazo).

APÊNDICE C

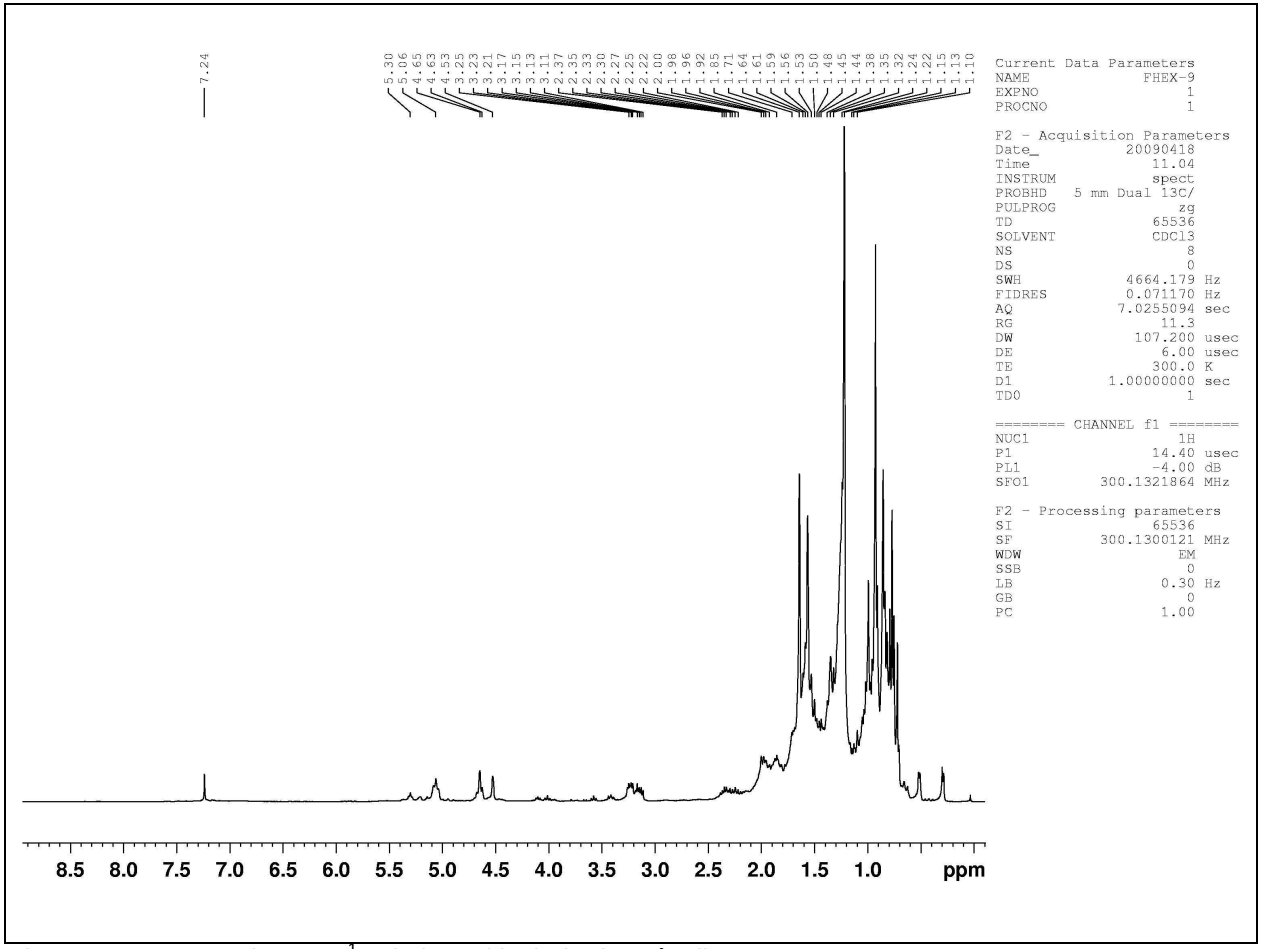


Figura 4 - Espectro de RMN ^{1}H do lupeol isolado da própolis

APÊNDICE D

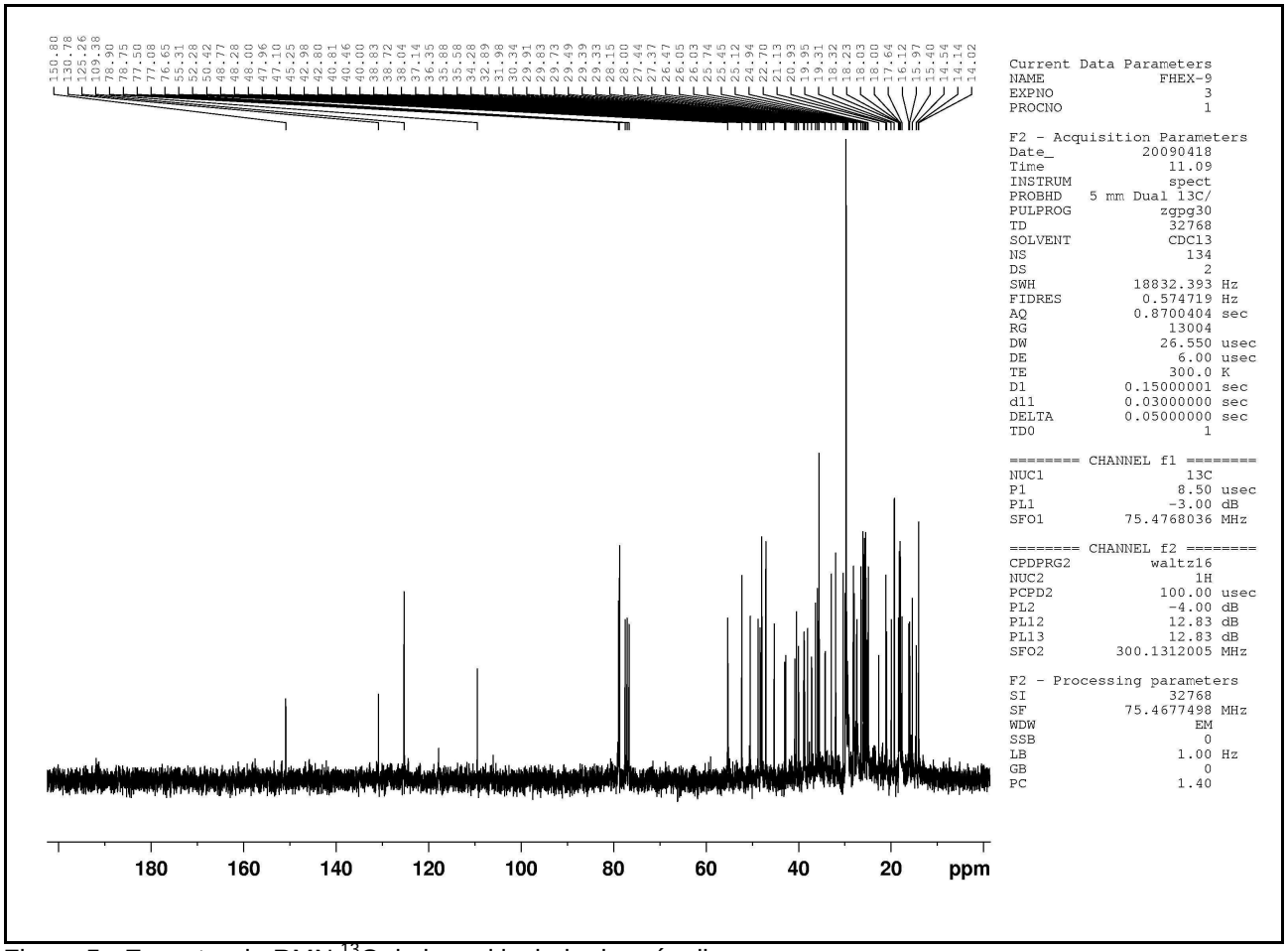


Figura 5 - Espectro de RMN ^{13}C do lupeol isolado da própolis.

APÊNDICE E

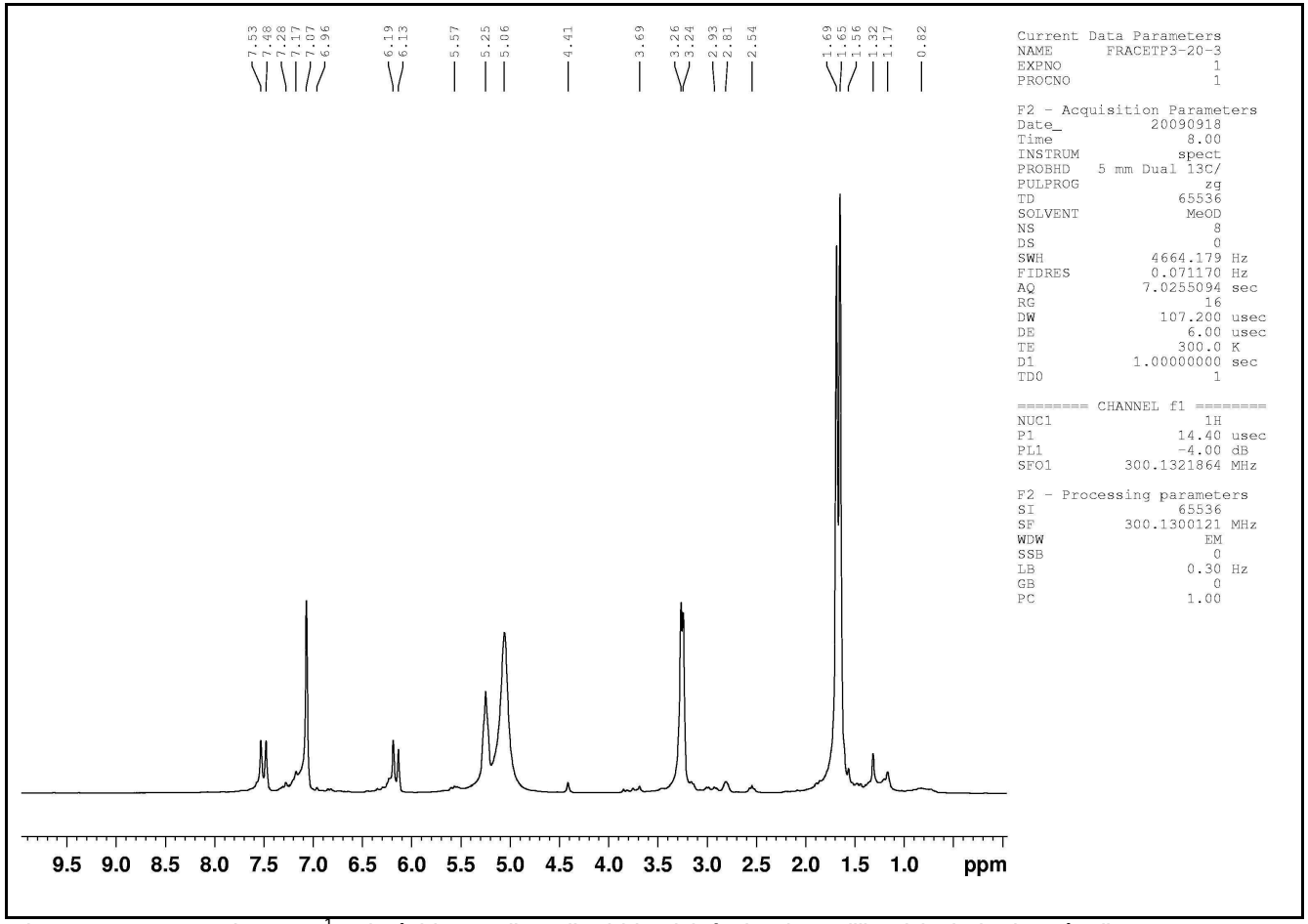


Figura 6 - Espectro de RMN ^{1}H do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) isolado da própolis.

APÊNDICE F

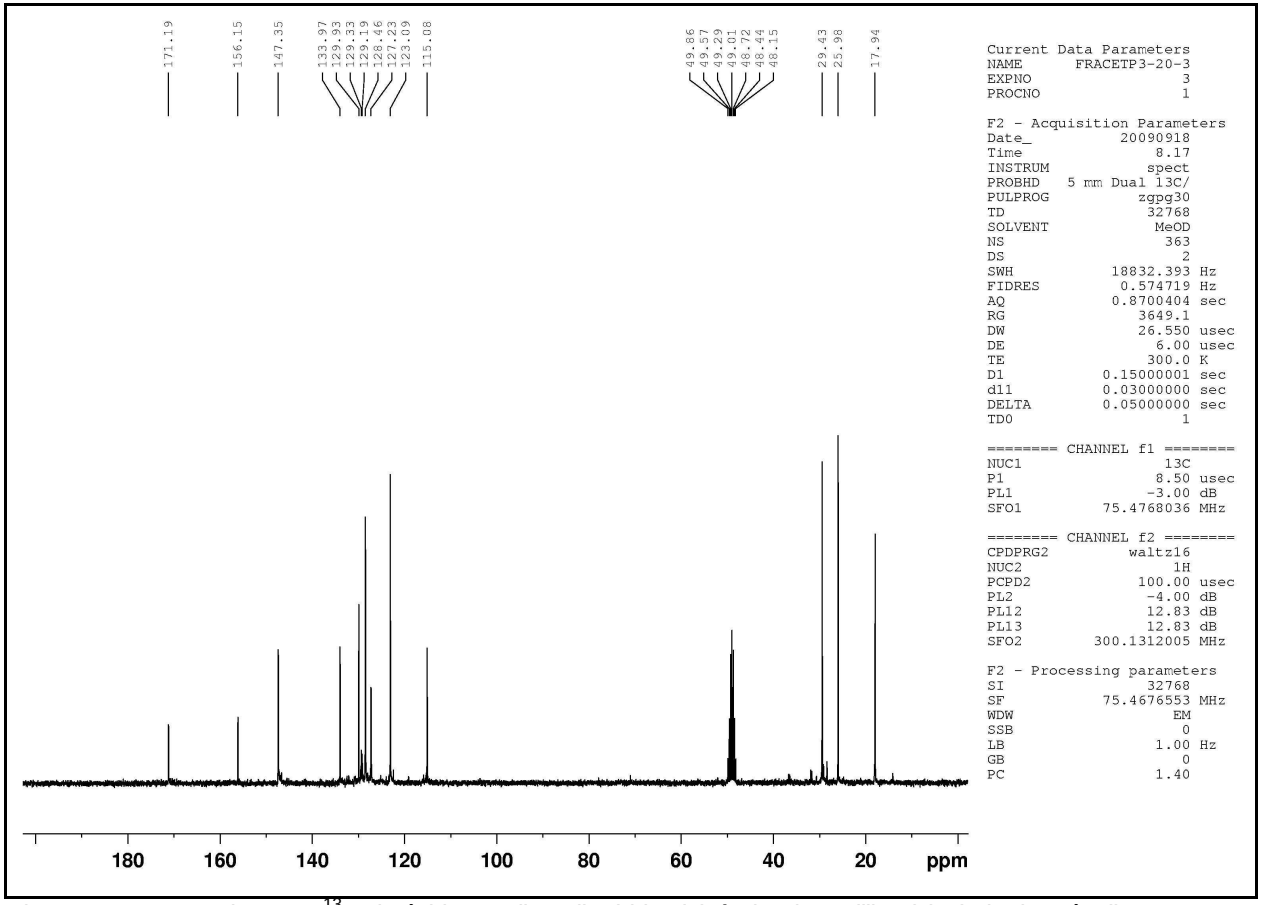


Figura 7 - Espectro de RMN ^{13}C do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) isolado da própolis.

APÊNDICE G

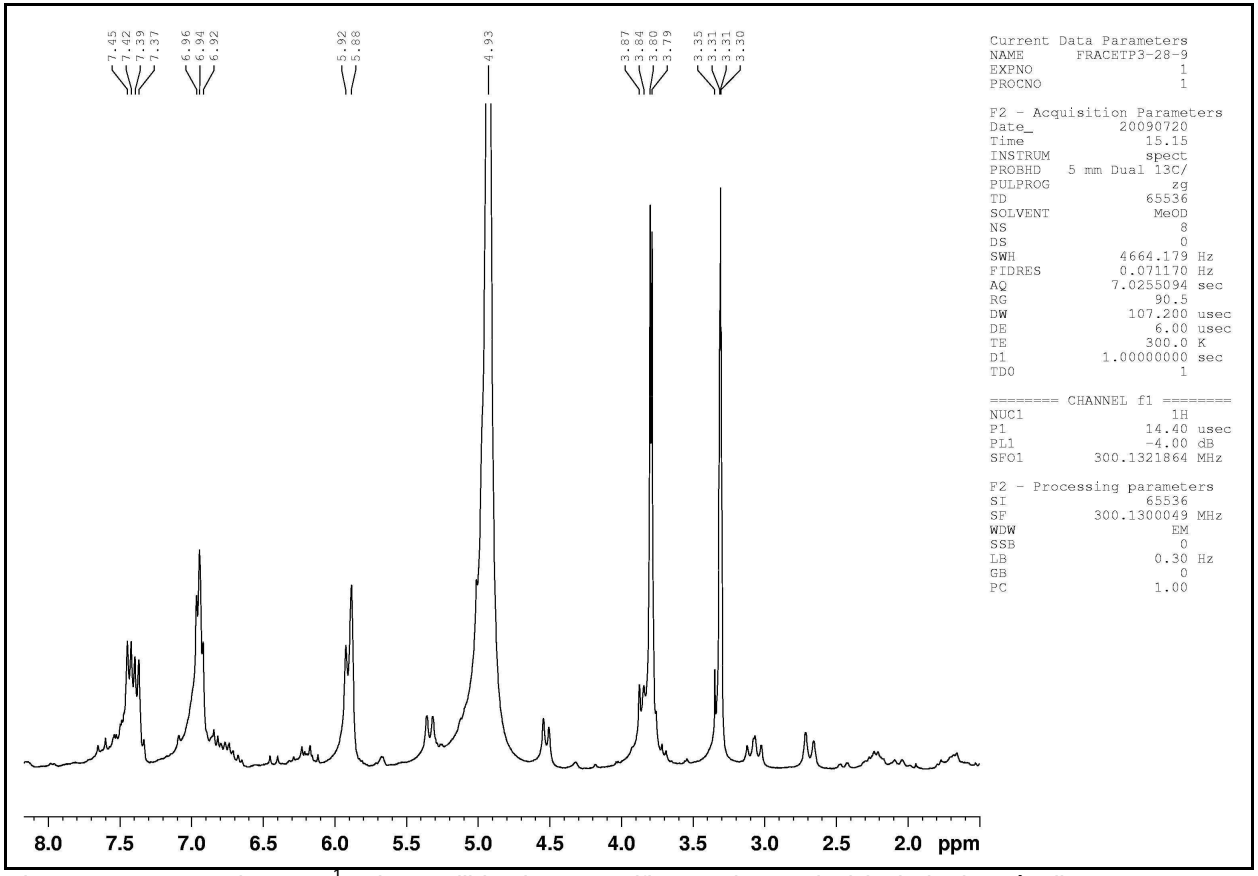


Figura 8 - Espectro de RMN ^{1}H do 5,7-diidroxi-4'-metoxiflavone (Acacetina) isolado da própolis.

APÊNDICE H

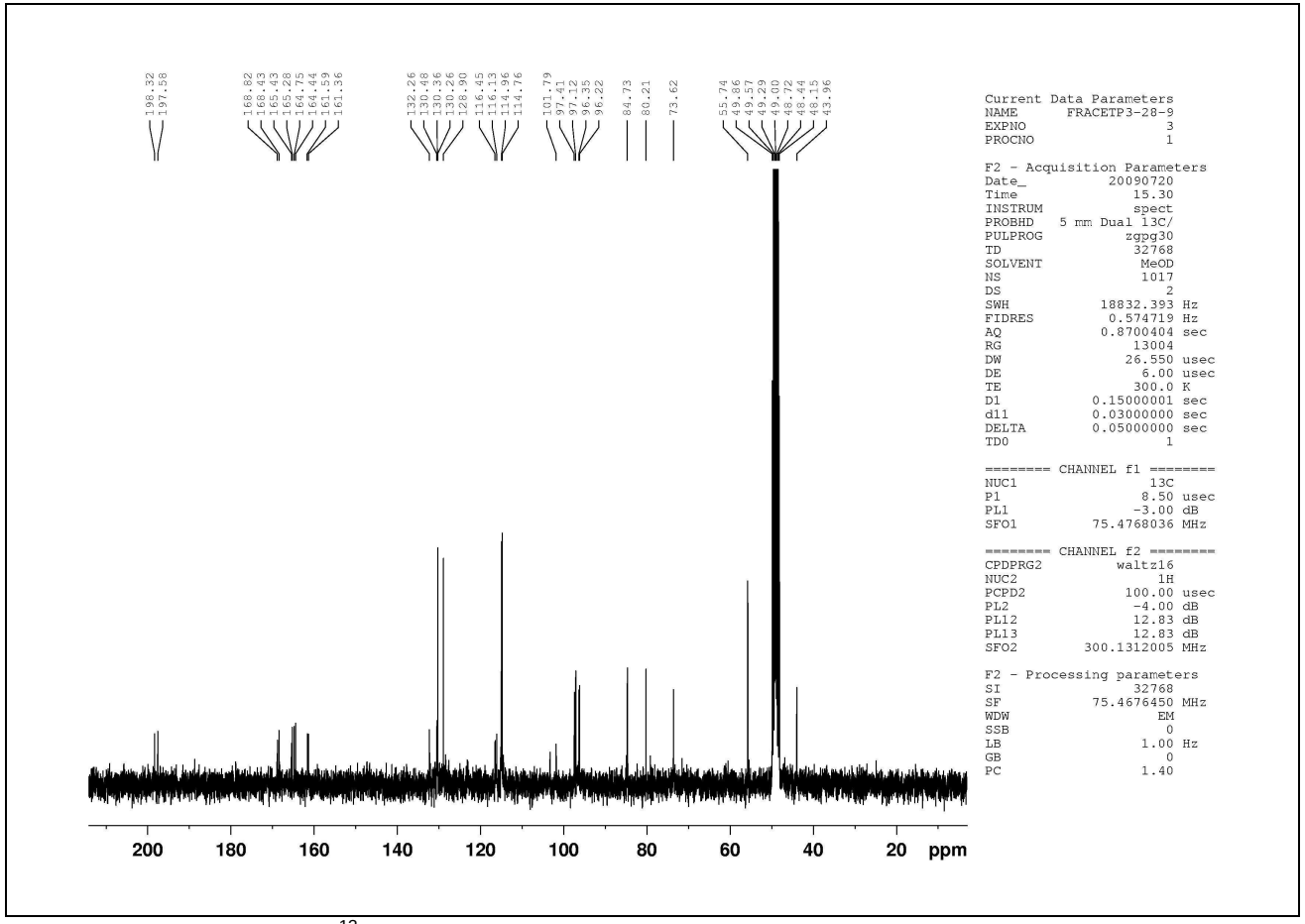


Figura 9 - Espectro de RMN ^{13}C da 5,7-diidroxi-4'-metoxiflavone (Acacetina) isolada da própolis.

APÊNDICE I

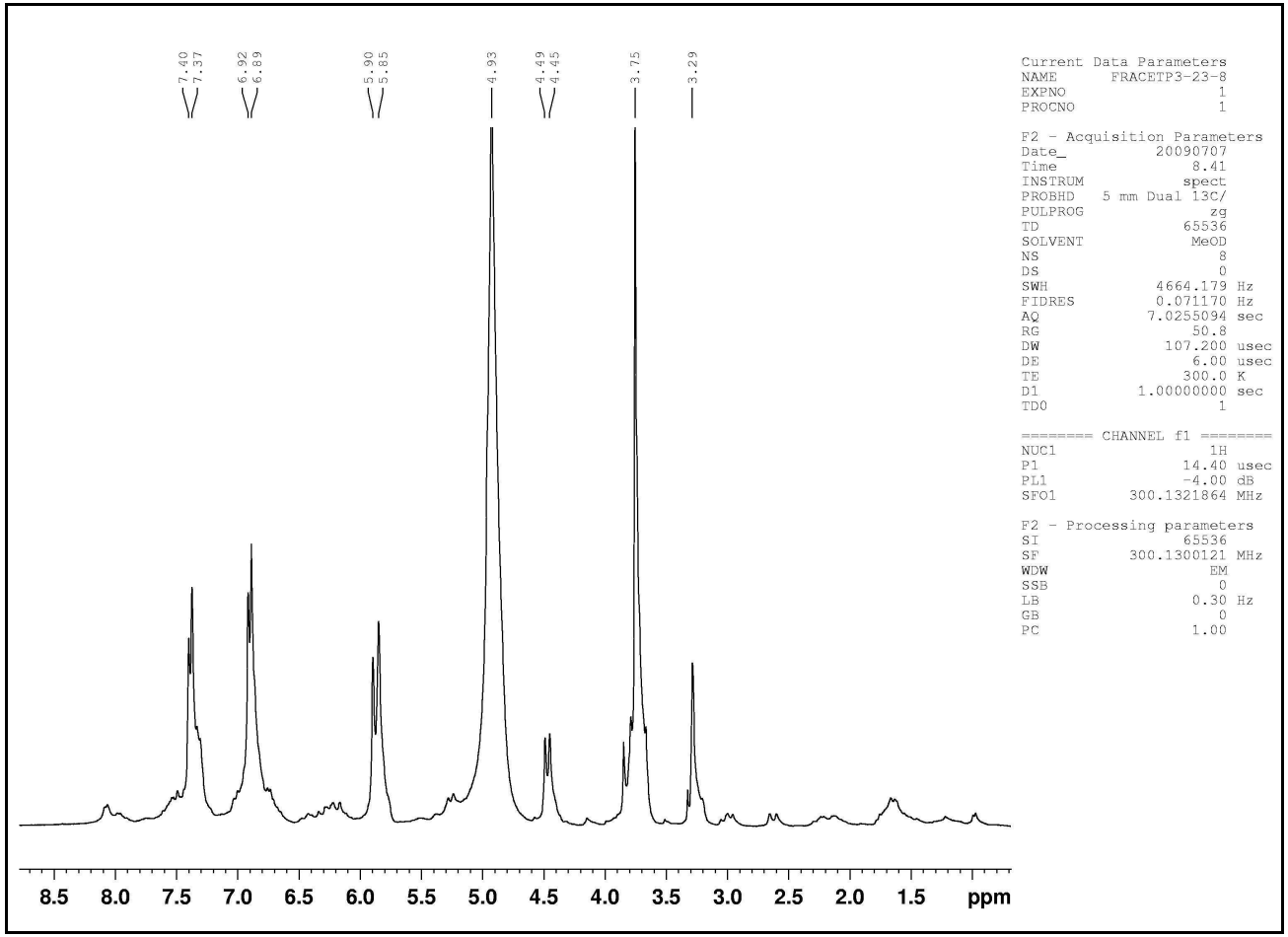


Figura 10 - Espectro de RMN ^{1}H do 3, 5,7 trihidroxi-4'-metoxiflavonol isolado da própolis.

APÊNDICE J

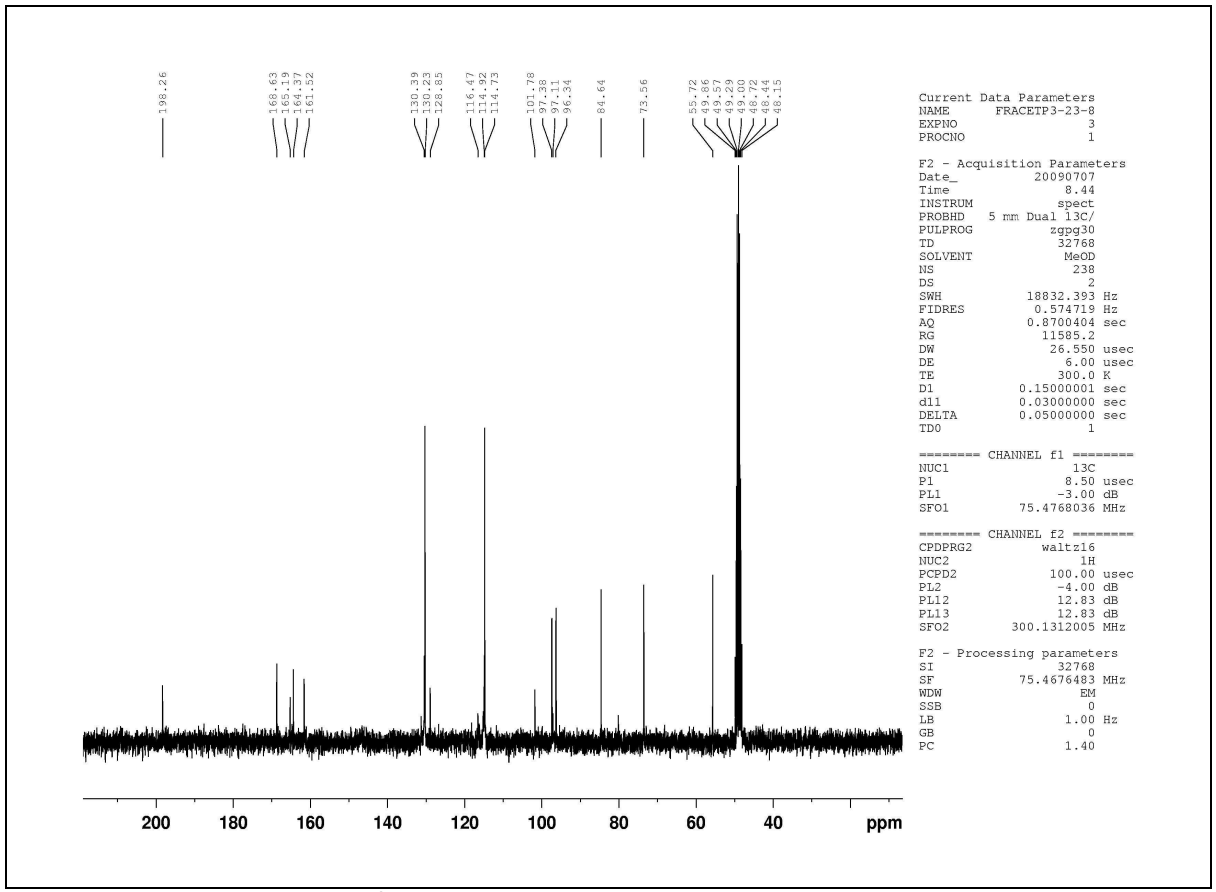


Figura 11 - Espectro de RMN ^{13}C do 3, 5,7 triihidroxi-4'-metoxiflavonol isolado da própolis.

APÊNDICE L

Tabela 1 - Valores originais correspondentes à proporção de células viáveis no teste de viabilidade celular a curto prazo.

Soluções		Experimento				
		1x	2x	3x	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
P (0,001%)+V/PG (0,03%)	24	1.13	1.00	1.09	1.07	0.07
P (0,01%)+V/PG (0,33%)	24	1.02	1.02	0.93	1.00	0.06
P (0,1%)+V/PG (3,33%)	24	1.11	1.00	0.92	1.01	0.11
P (0,5%)+V/PG (16,50%)	24	0.59	0.42	0.39	0.47	0.12
P (1%)+V/PG (33,00%)	24	0.24	0.18	0.19	0.21	0.04
V/PG (0,03%)	**24**	**0.98**	**1.01**	**1.00**	**1.00**	**0.02**
V/PG (0,33%)	**24**	**0.92**	**0.98**	**0.87**	**0.93**	**0.06**
V/PG (3,33%)	**24**	**0.98**	**0.94**	**0.85**	**0.93**	**0.08**
V/PG (16,50%)	**24**	**0.52**	**0.52**	**0.48**	**0.51**	**0.02**
V/PG (33,00%)	**24**	**0.31**	**0.31**	**0.29**	**0.31**	**0.01**
P (0,001%)+V (0,03%)	24	1.03	1.07	1.07	1.06	0.02
P (0,01%)+V (0,33%)	24	0.88	0.89	0.98	0.92	0.06
P (0,1%)+V (3,33%)	24	0.99	0.97	0.97	0.98	0.01
P (0,5%)+V (16,50%)	24	0.47	0.47	0.45	0.47	0.02
P (1%)+V (33,00%)	24	0.23	0.19	0.18	0.21	0.03
V (0,03%)	**24**	**1.02**	**1.04**	**1.11**	**1.06**	**0.05**
V (0,33%)	**24**	**0.96**	**0.95**	**1.05**	**0.99**	**0.06**
V (3,33%)	**24**	**0.92**	**0.94**	**0.97**	**0.95**	**0.03**
V (16,50%)	**24**	**0.69**	**0.76**	**0.92**	**0.79**	**0.14**
V (33,00%)	**24**	**0.27**	**0.29**	**0.51**	**0.36**	**0.16**
C +	24	0.99	0.98	1.02	1.00	0.02
C -	24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

APÊNDICE M

Tabela 2 - Valores originais correspondentes à proporção de células viáveis no teste de sobrevivência celular a longo prazo – “Placa X”.

PLACA X		1a proliferação			2a proliferação			3a proliferação			PROLIFERAÇÃO		
Soluções	Horas	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1ª	2ª	3ª
P (0,001%)+V/PG (0,03%)	168	1.14	1.11	1.04	1.08	0.94	0.92	0.97	0.94	1.00	1.10	0.98	0.97
P (0,01%)+V/PG (0,33%)	168	1.32	1.19	1.05	1.10	0.87	0.83	1.07	0.95	0.93	1.19	0.93	0.98
P (0,1%)+V/PG (3,3%)	168	1.55	1.26	1.28	0.94	0.90	0.74	1.00	0.99	0.93	1.36	0.86	0.97
V/PG (0,03%)	168	1.15	1.12	1.21	1.01	1.07	1.05	0.89	1.00	0.92	1.16	1.05	0.93
V/PG (0,33%)	168	1.06	1.13	1.15	0.58	0.56	0.86	0.86	0.91	0.92	1.12	0.67	0.89
V/PG (3,3%)	168	0.65	0.56	0.65	0.44	0.47	0.61	0.85	0.68	0.92	0.62	0.51	0.82
C +	168	1.29	1.15	0.56	1.15	1.00	0.85	1.07	0.93	0.99	1.00	1.00	1.00
C -	168	-0.05	0.02	0.04	-0.02	-0.02	0.04	0.01	0.00	-0.01	0.00	0.00	0.00
P (0,001%)+V/PG (0,03%)	**120**	**1.33**	**1.27**	**1.23**	**0.99**	**1.01**	**1.16**	**1.16**	**1.04**	**1.13**	**1.28**	**1.05**	**1.11**
P (0,01%)+V/PG (0,33%)	**120**	**1.33**	**1.20**	**1.29**	**0.95**	**0.91**	**0.90**	**1.09**	**1.08**	**1.03**	**1.27**	**0.92**	**1.07**
P (0,1%)+V/PG (3,3%)	**120**	**1.23**	**1.14**	**1.11**	**0.92**	**0.90**	**0.93**	**1.00**	**1.02**	**1.07**	**1.16**	**0.91**	**1.03**
V/PG (0,03%)	**120**	**1.25**	**1.19**	**1.28**	**0.98**	**1.10**	**1.02**	**1.05**	**1.20**	**1.07**	**1.24**	**1.04**	**1.11**
V/PG (0,33%)	**120**	**1.34**	**1.19**	**1.20**	**0.84**	**0.85**	**0.96**	**1.00**	**0.97**	**0.76**	**1.24**	**0.89**	**0.91**
V/PG (3,3%)	**120**	**0.69**	**0.76**	**0.79**	**0.70**	**0.67**	**0.82**	**0.63**	**0.70**	**0.69**	**0.75**	**0.73**	**0.67**
C +	**120**	**1.22**	**1.12**	**0.66**	**1.00**	**1.00**	**1.00**	**1.04**	**1.04**	**0.91**	**1.00**	**1.00**	**1.00**
C -	**120**	**0.09**	**0.04**	**-0.13**	**-0.02**	**-0.01**	**0.03**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
P (0,001%)+V/PG (0,03%)	72	0.95	1.26	0.87	1.19	1.01	1.19	0.87	0.89	0.89	1.03	1.13	0.88
P (0,01%)+V/PG (0,03%)	72	1.19	1.04	1.19	1.10	1.03	0.95	0.92	0.95	0.84	1.14	1.03	0.90
P (0,1%)+V/PG (3,3%)	72	1.18	1.19	1.09	1.09	1.00	1.01	0.94	0.91	0.92	1.15	1.03	0.92
V/PG (0,03%)	72	1.08	1.00	1.25	0.91	1.05	1.02	0.94	1.03	1.13	1.11	1.00	1.03
V/PG (0,33%)	72	0.98	1.08	1.27	0.76	0.85	0.93	0.88	0.85	1.09	1.11	0.85	0.94
V/PG (3,3%)	72	0.62	0.88	0.96	0.78	0.82	1.12	0.61	0.64	0.92	0.82	0.91	0.72
C +	72	1.25	0.99	0.76	1.04	0.97	0.99	0.97	1.03	1.00	1.00	1.00	1.00
C -	72	-0.07	0.05	0.02	-0.13	0.06	0.06	-0.03	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00
P (0,001%)+V/PG (0,03%)	**24**	**1.10**	**1.29**	**0.63**	**0.58**	**0.96**	**0.84**	**1.31**	**1.35**	**1.30**	**1.01**	**0.79**	**1.32**
P (0,01%)+V/PG (0,33%)	**24**	**1.48**	**1.29**	**1.10**	**0.84**	**0.95**	**0.94**	**1.49**	**1.43**	**1.46**	**1.29**	**0.91**	**1.46**
P (0,1%)+V/PG (3,3%)	**24**	**1.65**	**1.32**	**1.34**	**0.97**	**1.04**	**0.95**	**1.35**	**1.45**	**1.46**	**1.44**	**0.99**	**1.42**
V/PG (0,03%)	**24**	**1.01**	**0.72**	**1.31**	**0.82**	**0.80**	**0.78**	**1.40**	**1.43**	**1.51**	**1.01**	**0.80**	**1.45**
V/PG (0,33%)	**24**	**0.94**	**1.34**	**1.60**	**0.68**	**0.73**	**0.65**	**1.23**	**1.21**	**1.35**	**1.29**	**0.69**	**1.26**
V/PG (3,3%)	**24**	**1.10**	**1.24**	**1.39**	**0.80**	**0.74**	**0.68**	**1.21**	**1.35**	**1.31**	**1.24**	**0.74**	**1.29**
C +	**24**	**0.80**	**1.10**	**1.10**	**0.99**	**0.93**	**1.08**	**0.69**	**1.05**	**1.26**	**1.00**	**1.00**	**1.00**
C -	**24**	**-0.05**	**0.16**	**-0.12**	**0.10**	**-0.06**	**-0.03**	**0.16**	**0.11**	**-0.27**	**0.00**	**0.00**	**0.00**

APÊNDICE N

Tabela 3 - Valores originais correspondentes à proporção de células viáveis no teste de sobrevivência celular a longo prazo – “Placa Y”.

PLACA Y		1a proliferação			2ª proliferação			3a proliferação			PROLIFERAÇÃO		
Soluções	Horas	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1x	2x	3x	1a	2ª	3ª
P (0,001%)+V (0,03%)	**168**	**1.14**	**1.10**	**1.05**	**0.98**	**0.99**	**0.96**	**1.09**	**0.98**	**1.02**	**1.10**	**0.98**	**1.03**
P (0,01%)+V (0,33%)	**168**	**1.23**	**1.07**	**1.01**	**0.98**	**0.95**	**1.02**	**0.98**	**0.96**	**0.89**	**1.11**	**0.98**	**0.95**
P (0,1%)+V (3,3%)	**168**	**1.42**	**1.07**	**1.11**	**0.94**	**0.96**	**1.04**	**1.07**	**1.01**	**0.98**	**1.20**	**0.98**	**1.02**
V (0,03%)	**168**	**1.04**	**1.05**	**1.10**	**1.00**	**1.01**	**1.03**	**0.95**	**0.99**	**1.07**	**1.06**	**1.01**	**1.00**
V (0,33%)	**168**	**0.99**	**1.07**	**1.14**	**0.93**	**1.00**	**1.03**	**0.84**	**0.84**	**0.96**	**1.07**	**0.98**	**0.88**
V (3,3%)	**168**	**0.55**	**0.62**	**0.74**	**0.73**	**0.62**	**0.90**	**0.55**	**0.64**	**0.97**	**0.64**	**0.75**	**0.72**
C +	**168**	**1.28**	**1.12**	**0.60**	**1.05**	**0.96**	**0.99**	**1.03**	**0.96**	**1.02**	**1.00**	**1.00**	**1.00**
C -	**168**	**-0.05**	**0.01**	**0.05**	**-0.04**	**0.00**	**0.04**	**0.01**	**0.00**	**-0.01**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
P (0,001%)+V (0,03%)	120	0.95	1.19	1.06	0.91	0.97	0.94	1.07	1.10	1.17	1.07	0.94	1.11
P (0,01%)+V (0,33%)	120	1.26	1.07	1.10	1.01	0.92	0.94	1.03	1.06	1.08	1.14	0.96	1.06
P (0,1%)+V (3,3%)	120	1.29	1.17	1.01	0.95	0.92	0.94	1.03	0.95	1.02	1.16	0.93	1.00
V (0,03%)	120	1.09	1.02	1.07	0.92	0.95	0.97	1.21	1.24	1.34	1.06	0.95	1.26
V (0,33%)	120	0.97	1.00	0.98	0.87	0.89	0.98	1.00	1.01	1.09	0.98	0.91	1.03
V (3,3%)	120	0.67	0.77	0.74	0.71	0.71	0.86	1.03	0.81	1.15	0.73	0.76	1.00
C +	120	1.27	1.12	0.61	1.05	0.98	0.97	1.06	1.07	0.86	1.00	1.00	1.00
C -	120	-0.03	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	-0.01	0.02	-0.01	0.00	0.00	0.00
P (0,001%)+V (0,03%)	**72**	**0.93**	**1.10**	**1.08**	**1.10**	**1.05**	**1.11**	**0.86**	**0.98**	**1.11**	**1.04**	**1.09**	**0.98**
P (0,01%)+V (0,33%)	**72**	**1.07**	**1.00**	**0.93**	**1.17**	**0.87**	**0.92**	**1.04**	**0.87**	**0.82**	**1.00**	**0.99**	**0.91**
P (0,1%)+V (3,3%)	**72**	**1.10**	**0.93**	**0.97**	**1.13**	**1.04**	**1.10**	**0.98**	**1.01**	**0.90**	**1.00**	**1.09**	**0.96**
V (0,03%)	**72**	**1.07**	**1.06**	**1.15**	**0.94**	**1.09**	**0.92**	**0.93**	**1.12**	**0.95**	**1.09**	**0.98**	**1.00**
V (0,33%)	**72**	**1.02**	**0.93**	**1.01**	**0.86**	**0.95**	**1.02**	**0.74**	**0.92**	**1.00**	**0.99**	**0.95**	**0.89**
V (3,3%)	**72**	**0.58**	**0.82**	**1.22**	**0.92**	**0.98**	**1.13**	**0.65**	**0.76**	**0.99**	**0.87**	**1.01**	**0.80**
C +	**72**	**1.19**	**1.00**	**0.81**	**0.95**	**0.94**	**1.11**	**1.06**	**0.96**	**0.98**	**1.00**	**1.00**	**1.00**
C -	**72**	**-0.02**	**-0.04**	**0.06**	**0.00**	**-0.01**	**0.01**	**0.00**	**-0.06**	**0.06**	**0.00**	**0.00**	**0.00**
P (0,001%)+V (0,03%)	24	0.92	1.15	0.66	0.91	1.06	0.87	1.78	1.74	1.64	0.91	0.95	1.72
P (0,01%)+V (0,33%)	24	1.16	0.78	1.13	0.85	0.94	0.90	1.32	1.54	1.44	1.03	0.89	1.43
P (0,1%)+V (3,3%)	24	1.13	1.24	1.09	0.90	1.04	1.06	1.49	1.56	1.46	1.15	1.00	1.50
V (0,03%)	24	0.83	0.58	0.93	0.71	0.95	0.85	1.46	1.39	1.37	0.78	0.84	1.40
V (0,33%)	24	0.66	0.71	0.93	0.76	0.80	0.72	1.19	1.00	1.02	0.77	0.76	1.07
V (3,3%)	24	0.80	0.98	1.15	0.95	0.86	0.79	1.20	1.07	1.12	0.97	0.87	1.13
C +	24	0.99	1.01	0.99	0.97	0.98	1.04	0.87	0.95	1.19	1.00	1.00	1.00
C -	24	-0.30	0.19	0.11	-0.04	-0.04	0.08	-0.01	0.06	-0.04	0.00	0.00	0.00

Valores originais correspondentes à proporção de células viáveis no teste de sobevivência celular a longo prazo – “Placa Y”

APÊNDICE O

Tabela 4 - Valores das médias e desvios-padrões amostrais da viabilidade celular, das soluções com propilenoglicol, relativos aos cruzamentos solução x tempo x proliferação

TABELA 8 : PLACA "X" (SOLUÇÃO X TEMPO X PROLIFERAÇÃO)

SOLUÇÃO	1 DIA					3 DIAS					5 DIAS					7 DIAS					MÉDIA	DESV.PADR.
	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.	GERAL	GERAL
P (0,001%)+V/PG (0,03%)	1.006	0.793	1.319	1.039	0.302	1.028	1.131	0.885	1.014	0.157	1.277	1.052	1.110	1.147	0.102	1.097	0.981	0.970	1.016	0.065	1.054	0.185
P (0,01%)+V/PG (0,33%)	1.289	0.911	1.462	1.221	0.264	1.140	1.028	0.903	1.024	0.120	1.274	0.921	1.066	1.087	0.098	1.188	0.935	0.984	1.036	0.097	1.092	0.192
P (0,1%)+V/PG (3,33%)	1.439	0.987	1.418	1.281	0.243	1.150	1.035	0.924	1.036	0.105	1.159	0.915	1.027	1.034	0.122	1.363	0.860	0.974	1.066	0.145	1.104	0.210
V/PG (0,03%)	1.012	0.803	1.445	1.087	0.321	1.110	0.996	1.032	1.046	0.101	1.238	1.035	1.107	1.127	0.144	1.162	1.045	0.934	1.047	0.046	1.077	0.179
V/PG (0,33%)	1.295	0.685	1.264	1.081	0.343	1.110	0.849	0.942	0.967	0.156	1.241	0.887	0.910	1.013	0.067	1.115	0.667	0.895	0.892	0.100	0.988	0.237
V/PG (3,33%)	1.243	0.741	1.291	1.092	0.278	0.820	0.906	0.724	0.817	0.172	0.746	0.729	0.674	0.716	0.161	0.623	0.509	0.817	0.650	0.147	0.818	0.245
C +	1.000	1.000	1.000	1.000	0.173	1.000	1.000	1.000	1.000	0.126	1.000	1.000	1.000	1.000	0.185	1.000	1.000	1.000	1.000	0.180	1.000	0.162
C -	0.000	0.000	0.000	0.000	0.144	0.000	0.000	0.000	0.000	0.065	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.082
MÉDIA GERAL	1.035	0.740	1.150	0.975	-	0.920	0.868	0.801	0.863	-	0.992	0.817	0.862	0.890	-	0.944	0.750	0.822	0.838	-	0.892	-
DESVIO PADRÃO GERAL	0.473	0.314	0.480	-	0.458	0.391	0.354	0.330	-	0.358	0.433	0.334	0.364	-	0.381	0.438	0.337	0.342	-	0.358	-	0.397

APÊNDICE P

Tabela 5 - Valores das médias e desvios-padrões amostrais da viabilidade celular, das soluções com propilenoglicol, relativos aos cruzamentos solução x tempo x proliferação

TABELA 9 : PLACA "Y" (SOLUÇÃO X TEMPO X PROLIFERAÇÃO)

SOLUÇÃO	1 DIA					3 DIAS					5 DIAS					7 DIAS					MÉDIA GERAL	DESV.PADR. GERAL
	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.	1a. PR.	2a. PR.	3a. PR.	MÉDIA	DESV. PADR.		
P (0,001%)+V (0,03%)	0.909	0.945	1.719	1.191	0.419	1.037	1.088	0.984	1.036	0.091	1.065	0.941	1.114	1.040	0.102	1.098	0.976	1.031	1.035	0.065	1.076	0.224
P (0,01%)+V (0,33%)	1.025	0.894	1.433	1.117	0.272	1.002	0.986	0.911	0.966	0.115	1.144	0.957	1.059	1.054	0.098	1.108	0.983	0.945	1.012	0.097	1.037	0.166
P (0,1%)+V (3,33%)	1.152	1.000	1.500	1.217	0.231	1.002	1.090	0.962	1.018	0.081	1.155	0.934	1.000	1.030	0.122	1.201	0.977	1.021	1.066	0.145	1.083	0.169
V (0,03%)	0.782	0.839	1.404	1.008	0.318	1.092	0.981	1.000	1.024	0.090	1.059	0.948	1.262	1.090	0.144	1.064	1.014	1.004	1.028	0.046	1.037	0.176
V (0,33%)	0.766	0.762	1.067	0.865	0.177	0.988	0.945	0.887	0.940	0.092	0.981	0.910	1.035	0.975	0.067	1.068	0.984	0.877	0.976	0.100	0.939	0.121
V (3,33%)	0.975	0.868	1.129	0.991	0.153	0.874	1.012	0.799	0.895	0.212	0.727	0.761	0.997	0.828	0.161	0.637	0.750	0.720	0.702	0.147	0.854	0.194
C +	1.000	1.000	1.000	1.000	0.085	1.000	1.000	1.000	1.000	0.111	1.000	1.000	1.000	1.000	0.185	1.000	1.000	1.000	1.000	0.180	1.000	0.140
C -	0.000	0.000	0.000	0.000	0.138	0.000	0.000	0.000	0.000	0.041	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.071
MÉDIA GERAL	0.826	0.789	1.157	0.924	-	0.874	0.888	0.818	0.860	-	0.891	0.806	0.933	0.877	-	0.897	0.836	0.825	0.852	-	0.878	-
DESVIO PADRÃO GERAL	0.373	0.321	0.509	-	0.436	0.363	0.354	0.335	-	0.348	0.387	0.321	0.377	-	0.361	0.403	0.337	0.342	-	0.358	-	0.377

APÊNDICE Q

Tabela 6 – Teste de Significância das Variáveis (ANOVA) – Soluções com propilenoglicol. Variável Dependente: Viabilidade

Fonte de variação	**Soma de quadrados**	**GL**	**Quadrado médio**	**F**	**Sig**
Modelo	12,251[a]	31	,395	14,081	**,000**
Constante do modelo (Intercept)	76,309	1	76,309	2718,943	**,000**
Soluções	**11,603**	**7**	**1,658**	**59,062**	**,000**
Tempo	**,256**	**3**	**,085**	**3,046**	**,035**
Soluções * Tempo	,391	21	,019	,664	,851
Erro	1,796	64	,028		
Total	90,356	96			
Total corrigido	14,047	95			

a. Coeficiente de determinação (R Squared) = ,872 (Adjusted R Squared = ,810)
b. Veículo = Propilenoglicol (Placa X)

GL = Graus de liberdade
F = Valor da estatística de teste
Sig = Significância do teste

APÊNDICE R

Tabela 7 – Teste de Significância das Variáveis (ANOVA) – Soluções sem propilenoglicol. Variável Dependente: Viabilidade

Fonte de variação	**Soma de quadrados**	**GL**	**Quadrado médio**	**F**	**Sig**
Modelo	11,394[a]	31	,368	17,732	**,000**
Constante do modelo (Intercept)	74,061	1	74,061	3572,795	**,000**
Soluções	**11,062**	**7**	**1,580**	**76,234**	**,000**
Tempo	,074	3	,025	1,184	,323
Soluções * Tempo	,259	21	,012	,595	,907
Erro	1,327	64	,021		
Total	86,782	96			
Total corrigido	12,721	95			

c. Coeficiente de determinação (R Squared) = ,896 (Adjusted R Squared = ,845)
d. Veículo = Álcool (Placa Y)

GL = Graus de liberdade
F = Valor da estatística de teste
Sig = Significância do teste

APÊNDICE S

Tabela 8 – Viabilidade – Teste Tukey HSD (Comparações Múltiplas – "Soluções Experimentais")

(I) Soluções	(J) Soluções	Diferença das médias (I – J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de confiança	
					Limite superior	Limite inferior
P(0,001%)+V/PG (0,03%)	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	-,0367	,06839	,999	-,2510	,1776
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	-,0492	,06839	,996	-,2635	,1651
	V/PG (0,03%)	-,0233	,06839	1,000	-,2376	,1910
	V/PG (0,33%)	,0658	,06839	,978	-,1485	,2801
	V/PG (3,3%)	**,2358***	**,06839**	**,021**	,0215	,4501
	C+	,0542	,06839	,993	-,1601	,2685
	C-	**1,0542***	**,06839**	**,000**	,8399	1,2685
P(0,01%)+V/PG (0,33%)	P(0,001%) + V/PG (0,03%)	,0367	,06839	,999	-,1776	,2510
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	-,0125	,06839	1,000	-,2268	,2018
	V/PG (0,03%)	,0133	,06839	1,000	-,2010	,2276
	V/PG (0,33%)	,1025	,06839	,805	-,1118	,3168
	V/PG (3,3%)	**,2725***	**,06839**	**,004**	,0582	,4868
	C+	,0908	,06839	,885	-,1235	,3051
	C-	**1,0908***	**,06839**	**,000**	,8765	1,3051
P(0,1%)+V/PG (3,3%)	P(0,001%) + V/PG (0,03%)	,0492	,06839	,996	-,1651	,2635
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	,0125	,06839	1,000	-,2018	,2268
	V/PG (0,03%)	,0258	,06839	1,000	-,1885	,2401
	V/PG (0,33%)	,1150	,06839	,669	-,0993	,3293
	V/PG (3,3%)	**,2850***	**,06839**	**,002**	,0707	,4993
	C+	,1033	,06839	,799	-,1110	,3176
	C-	**1,1033***	**,06839**	**,000**	,8890	1,3176
V/PG (0,03%)	P(0,001%) + V/PG (0,03%)	,0233	,06839	1,000	-,1910	,2376
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	-,0133	,06839	1,000	-,2276	,2010
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	-,0258	,06839	1,000	-,2401	,1885
	V/PG (0,33%)	,0892	,06839	,894	-,1251	,3035
	V/PG (3,3%)	**,2592***	**,06839**	**,008**	,0449	,4735
	C+	,0775	,06839	,947	-,1368	,2918
	C-	**1,0775***	**,06839**	**,000**	,8632	1,2918
V/PG (0,33%)	P(0,001%) + V/PG (0,03%)	-,0658	0,6839	,978	-,2801	,1485
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	-,1025	,06839	,805	-,3168	,1118
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	-,1150	,06839	,699	-,3293	,0993
	V/PG (0,03%)	-,0892	,06839	,894	-,3035	,1251
	V/PG (3,3%)	,1700	,06839	,220	-,0443	,3843
	C+	-,0117	,06839	1,000	-,2260	,2026
	C-	**,9883***	**,06839**	**,000**	,7740	1,2026

Continuação – APÊNDICE S

(I) Soluções	(J) Soluções	Diferença das médias (I – J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de confiança	
					Limite superior	Limite inferior
V/PG (3,3%)	**P(0,001%) + V/PG (0,03%)**	**-,2358***	**,06839**	**,021**	-,4501	-,0215
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	**-,2725***	**,06839**	**,004**	-,4868	-,0582
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	**-,2850***	**0,6839**	**,002**	-,4993	-,0707
	V/PG (0,03%)	**-,2592***	**,06839**	**,008**	-,4735	-,0449
	V/PG (0,33%)	-,1700	,06839	,220	-,3843	,0443
	C+	-,1817	,06839	,156	-,3960	,0326
	C-	**,8183***	**,06839**	**,000**	,6040	1,0326
C +	P(0,001%) + V/PG (0,03%)	-,0542	,06839	,993	-,2685	,1601
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	-,0908	,06839	,885	-,3051	,1235
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	-,1033	,06839	,799	-,3176	,1110
	V/PG (0,03%)	-,0775	,06839	,947	-,2918	,1368
	V/PG (0,33%)	,0117	,06839	1,000	-,2026	,2260
	V/PG (3,3%)	,1817	,06839	,156	-,0326	,3960
	C-	**1,0000***	**,06839**	**,000**	,7857	1,2143
C -	**P(0,001%) + V/PG (0,03%)**	**-1,0542***	**0,6839**	**,000**	-1,2685	-,8399
	P(0,01%) + V/PG (0,33%)	**-1,0908***	**0,6839**	**,000**	-1,3051	-,8765
	P(0,1%) + V/PG (3,3%)	**-1,1033***	**,06839**	**,000**	-1,3176	-,8890
	V/PG (0,03%)	**-1,0775***	**,06839**	**,000**	-1,2918	-,8632
	V/PG (0,33%)	**-,9883***	**,06839**	**,000**	-1,2026	-,7740
	V/PG (3,3%)	**-,8183***	**,06839**	**,000**	-1,0326	-,6040
	C+	**-1,0000***	**,06839**	**,000**	-1,2143	-,7857

Baseado nas médias amostrais observadas.

Erro quadrático médio = ,028.
A diferença de médias foi significante ao nível de 0,05.
a. Veículo = Propilenoglicol (Placa X)

APÊNDICE T

Tabela 9 – Viabilidade – Teste Tukey HSD (Comparações Múltiplas – “Soluções Experimentais”)

(I) Soluções	(J) Soluções	Diferença das médias (I – J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de confiança	
					Limite superior	Limite inferior
P(0,001%)+V (0,03%)	P(0,01%) + V (0,33%)	,0392	,05878	,998	-,1450	,2233
	P(0,1%) + V (3,3%)	-,0058	,05878	1,000	-,1900	,1783
	V (0,03%)	,0408	,05878	,997	-,1433	,2250
	V (0,33%)	,1367	,05878	,297	-,0475	,3208
	V (3,3%)	**,2225***	**,05878**	**,008**	,0383	,4067
	C+	,0767	,05878	,894	-,1075	,2608
	C-	**1,0767***	**,05878**	**,000**	,8925	1,2608
P(0,01%)+V (0,33%)	P(0,001%) + V (0,03%)	-,0392	,05878	,998	-,2233	,1450
	P(0,1%) + V (3,3%)	-,0450	,05878	,994	-,2292	,1392
	V (0,03%)	,0017	,05878	1,000	-,1825	,1858
	V (0,33%)	,0975	,05878	,713	-,0867	,2817
	V (3,3%)	,1833	,05878	,052	-,0008	,3675
	C+	,0375	,05878	,998	-,1467	,2217
	C-	**1,0375**	**,05878**	**,000**	,8533	1,2217
P(0,1%)+V (3,3%)	P(0,001%) + V (0,03%)	,0058	,05878	1,000	-,1783	,1900
	P(0,01%) + V (0,33%)	,0450	,05878	,994	-,1392	,2292
	V (0,03%)	,0467	,05878	,993	-,1375	,2308
	V (0,33%)	,1425	,05878	,248	-,0417	,3267
	V (3,3%)	**,2283***	**,05878**	**,006**	,0442	,4125
	C+	,0825	,05878	,852	-,1017	,2667
	C-	**1,0825***	**,05878**	**,000**	,8983	1,2667
V (0,03%)	P(0,001%) + V (0,03%)	-,0408	,05878	,997	-,2250	,1433
	P(0,01%) + V (0,33%)	-,0017	,05878	1,000	-,1858	,1825
	P(0,1%) + V (3,3%)	-,0467	,05878	,993	-,2308	,1375
	V (0,33%)	,0958	,05878	,730	-,0883	,2800
	V (3,3%)	,1817	,05878	,056	-,0025	,3658
	C+	,0358	,05878	,999	-,1483	,2200
	C-	**1,0358***	**,05878**	**,000**	,8517	1,2200
V (0,33%)	P(0,001%) + V (0,03%)	-,1367	,05878	,297	-,3208	,0475
	P(0,01%) + V (0,33%)	-,0975	,05878	,713	-,2817	,0867
	P(0,1%) + V (3,3%)	-,1425	,05878	,248	-,3267	,0417
	V (0,03%)	-,0958	,05878	,730	-,2800	,0883
	V (3,3%)	,0858	,05878	,825	-,0983	,2700
	C+	-,0600	,05878	,970	-,2442	,1242
	C-	**,9400***	**,05878**	**,000**	,7558	1,1242

Continuação – APÊNDICE T

(I) Soluções	(J) Soluções	Diferença das médias (I – J)	Erro Padrão	Sig.	95% Intervalo de confiança	
					Limite superior	Limite inferior
V (3,3%)	**P(0,001%) + V (0,03%)**	**-,2225***	**,05878**	**,008**	-,4067	-,0383
	P(0,01%) + V (0,33%)	-,1833	,05878	,052	-,3675	,0008
	P(0,1%) + V (3,3%)	**-,2283***	**,05878**	**,006**	-,4125	-,0442
	V (0,03%)	-,1817	,05878	,056	-,3658	,0025
	V (0,33%)	-,0858	,05878	,825	-,2700	,0983
	C+	-,1458	,05878	,222	-,3300	,0383
	C-	**,8542***	**,05878**	**,000**	,6700	1,0383
C +	P(0,001%) + V (0,03%)	-,0767	,05878	,894	-,2608	,1075
	P(0,01%) + V (0,33%)	-,0375	,05878	,998	-,2217	,1467
	P(0,1%) + V (3,3%)	-,0825	,05878	,852	-,2667	,1017
	V (0,03%)	-,0358	,05878	,999	-,2200	,1483
	V (0,33%)	,0600	,05878	,970	-,1242	,2442
	V (3,3%)	,1458	,05878	,222	-,0383	,3300
	C-	**1,0000***	**,05878**	**,000**	,8158	1,1842
C -	**P(0,001%) + V (0,03%)**	**-1,0767***	**,05878**	**,000**	-1,2608	-,8925
	P(0,01%) + V (0,33%)	**-1,0375***	**,05878**	**,000**	-1,2217	-,8533
	P(0,1%) + V (3,3%)	**-1,0825***	**,05878**	**,000**	-1,2667	-,8983
	V (0,03%)	**-1,0358***	**,05878**	**,000**	-1,2200	-,8517
	V (0,33%)	**-,9400***	**,05878**	**,000**	-1,1242	-,7558
	V (3,3%)	**-,8542***	**,05878**	**,000**	-1,0383	-,6700
	C +	**-1,0000***	**.05878**	**,000**	-1,1842	-,8158

Baseado nas médias amostrais observadas.

Erro quadrático médio = ,021.
A diferença de médias foi significante ao nível de 0,05.
a. Veículo = Álcool (Placa Y).

ANEXO A

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1259 da Pesquisadora Clarissa Rocha Martinez intitulado ***"Avaliação "in vitro" da citotoxidade da solução hidroalcoólica de própolis com e sem propilenoglicol em fibroblastos de mucosa bucal humana"****, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 26 de setembro de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

Prof. Odair Pimentel Martins
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 26 de setembro de 2008.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

ANEXO B

AUTORIZAÇÃO

Autorizo à aluna Clarissa Rocha Martinez a utilizar as células denominadas FLM (fibroblastos de mucosa oral), sob a guarda do Banco de Células do Laboratório de Bioodontologia da Universidade Ibirapuera para o projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação da citotoxicidade *"in vitro"* da solução hidroalcoólica de própolis com e sem propilenoglicol em fibroblastos de mucosa bucal humana." A validade desta autorização está condicionada à aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

São Paulo, 28 de maio de 2009.

Miriam R. Faria

Profa. Miriam Rubio Faria
Responsável pelo Banco de Células
Laboratório de Bioodontologia
Universidade Ibirapuera