

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Cristiana Madjarof

***“Atividade Antitumoral, Antiinflamatória e Antiulcerogênica de Duas
Variedades de Própolis Brasileira”***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Cristiana Madjarof
Guia
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M265a	Madjarof, Cristiana Atividade antitumoral, antiinflamatória e antiulcerogênica de duas variedades de própolis brasileira / Cristiana Madjarof. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientador: João Ernesto de Carvalho. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Agentes antineoplásicos. 2. Agentes antiinflamatórios. 3. Drogas antiulcerogênicas. 4. Própolis. I. Carvalho, João Ernesto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.
--------------	---

Título em inglês: Antitumoral, antiinflammatory and antiulcerogenic activity of two types of brazilian propolis.

Palavras-chave em inglês: Antineoplastic agents; Antiinflammatory agents; Antiulcer drugs; Propolis.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: João Ernesto de Carvalho, Alexandre Rodrigues, Cristina Pontes Vicente, Rosilene Fernandes da Rocha, Masaharu Ikegaki.

Data da defesa: 14/12/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 14 de Dezembro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho (Orientador)



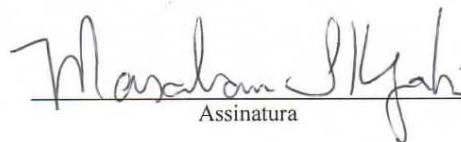
Assinatura

Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha



Assinatura

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki



Assinatura

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente



Assinatura

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues



Assinatura

Profa. Dra. Maria Teresa Bertoldo Pacheco



Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel



Assinatura

Profa. Dra. Mary Ann Foglio



Assinatura

Agradeço,

A Deus acima de tudo pela força...

À Maria Iraci, minha mãe, pelo apoio ao longo de todos os anos de minha vida,

A Estefano, meu pai, por me incentivar a continuar estudando, mesmo nos momentos mais difíceis,

Aos irmãos Vitor e Otavio pelo carinho,

A Eduardo, pelo afeto e amizade...

Ao meu orientador João Ernesto de Carvalho por simplesmente confiar no meu trabalho,

À querida Sirlene Valério Tinti pela paciência e colaboração nos experimentos realizados,

Aos colegas de trabalho, Maria Carolina, Karin, Juliana (muita saudades...), Marcilene, Débora, Gabriela, Michele, Vanessa, Ana, Giovana, Larissa e Humberto pelo apoio e amizade no ambiente de trabalho,

À Ana Lucia (Aninha), pela super ajuda em muitos momentos de dificuldades e incertezas...

À pequena Mel, pelo amor incondicional..., em todos os momentos,

A Luis Fernando pelo carinho, apoio e recomeço...

Ao Professor Doutor Severino Matias de Alencar e a todos os seus alunos em especial, Ingrid, Tatiane e Milena, que gentilmente colaboraram conosco, tornando esse trabalho ainda mais especial,

À Liliam Alves Senne Panagio, secretária do Departamento de Biologia Celular, pela "super" ajuda e dedicação,

Ao CNPq pelo apoio financeiro,

Enfim, a todos que moram no meu coração e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A própolis é uma resina coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* e atualmente esse produto vem se destacando por apresentar propriedades biológicas interessantes, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antiulcerogênica, antiviral, antioxidante e anticâncer. A própolis brasileira apresenta uma constituição química diferenciada principalmente pela diversidade de espécies vegetais para a retirada de resina; variação esta que aponta para a necessidade de novas investigações tanto da composição química quanto das propriedades biológicas das própolis encontradas em diferentes regiões do país. Neste trabalho, duas novas variedades de própolis, a vermelha (Alagoas) e a pertencente ao grupo 6 (Bahia), foram avaliadas quanto às atividades antitumoral, antiinflamatória e antiulcerogênica revelando resultados diferenciados e promissores com relação a essas atividades. Ambos os extratos brutos das própolis demonstraram atividade antiproliferativa nos ensaios *in vitro* em cultura de células tumorais, bem como suas frações e compostos isolados; mas quando avaliadas *in vivo*, observou-se que a própolis vermelha demonstrou maior potência e baixa toxicidade. O mesmo foi observado nos ensaios *in vivo* para atividade antiinflamatória, podendo essa atividade, estar relacionada à atividade antitumoral. Já para a atividade antiulcerogênica ambas as própolis reduziram o volume de secreção gástrica, sendo esse o provável mecanismo de ação para essa atividade.

Abstract

Propolis is a resinous product collected by *Apis mellifera* bees and has been used as a pharmaceutical because of its antimicrobial, antiinflammatory, antiulcer, antiviral, antioxidant and anticancer activities. Depending on the region, Brazilian propolis has presented a different chemical composition has a composition reflecting the rich biodiversity of vegetal species to collect the resins. This suggests that further studies are needed to investigate biological properties and chemical composition of each regional propolis. The aim of this study was to investigate antitumoral, antiinflammatory and antiulcerogenic activities of two new types of propolis, collected in Alagoas (called Red Propolis) and in Bahia (a propolis from Group 6). Both propolis etanolic crude extracts had demonstrated an antiproliferative activity *in vitro* in human tumoral cells, as well their fractions and isolated compounds, although *in vivo* evaluation pointed out that red propolis was more efficient and less toxic. The same result was observed to antiinflammatory activity and probably there is a relationship with antitumoral activity. Antiulcerogenic activity of both própolis was significative and probably due to gastric secretion reduction as the pharmacological mechanism of action.

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO 1	16
1- INTRODUÇÃO: ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTITUMORAL.....	16
1.1-Incidência do câncer	16
1.2-Aspectos Gerais do câncer	17
1.3 -Tratamento do Câncer	17
1.4- Produtos De Origem Natural e Atividade Antitumoral	19
2- MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 - Coleta das Amostras	23
2.2 - Tratamento das Própolis Brutas	23
2.3 - Preparo dos Extratos Etanólicos	23
2.4 - Fracionamento dos Extratos Brutos Etanólicos da Própolis Vermelha (EEPV) e G6 (EEG6) (Fluxograma)	24
2.5 – Avaliação da atividade Antiproliferativa in vitro dos Extratos Brutos Frações e Compostos Isolados das Própolis Vermelha e G6	26
2.6.- Ensaio in vivo	29
3 – RESULTADOS	34
3.1 – Avaliação da atividade Antiproliferativa in vitro dos Extratos Brutos, Frações e Compostos Isolados das Própolis Vermelha e G6	34
3.2 – Estruturas químicas dos compostos isolados	44
3.3 – Ensaio in vivo	46
3.3.1.- Teste de Toxicidade Aguda	46
4 - DISCUSSÃO	51
CAPÍTULO 2	62
1- INTRODUÇÃO: ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA	62
1.1.- Principais Mediadores Inflamatórios	64
1.2 -Principais Agentes Antiinflamatórios	67
1.3 - Produtos De Origem Natural e Atividade Antiinflamatória	68
2 – MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1 - Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton (Ação Tópica)	71
2.2 - Edema de pata induzido por carragenina (Ação Sistêmica)	71
3.- RESULTADOS.....	73
3.1 - Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton	73

3.2 - Edema de Pata Induzido por Carragenina	74
4 - DISCUSSÃO	75
CAPITULO 3	80
1 – INTRODUÇÃO:ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA.....	80
1.1 - Úlcera Péptica	80
1.2 - Mecanismos de Defesa da Mucosa Gástrica	81
1.3 - Regulação da Secreção Gástrica	83
1.4 - Produtos de Origem Natural e Atividade Antiulcerogênica	86
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1 – Atividade Antiulcerogênica induzida por Etanol	89
2.2 - Atividade Antiulcerogênica: Triagem do Mecanismo de Citoproteção	90
2.3 - Atividade Antisecretória do EEPV e EEG6	92
2.4 - Atividade anti-secretória dos extratos etanólicos (EEPV) e (EEG6) em ratos estimulados com os secretagogos betanecol (B), pentagastrina (P) e histamina (H)	93
3 - RESULTADOS.....	94
3.1 - Atividade Antiulcerogênica induzida por Etanol	94
3.2 - Atividade Antiulcerogênica: Triagem do Mecanismo de Citoproteção.	95
3.3 – Atividade Antisecretória do EEPV e EEG6	96
3.4 - Atividade anti-secretória dos extratos etanólicos (EEPV) e (EEG6) em ratos estimulados com os secretagogos betanecol (B), pentagastrina (P) e histamina (H)	98
4 - DISCUSSÃO	100
CONCLUSÕES GERAIS	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXOS	130

Introdução Geral

Própolis

A própolis é uma resina coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exudados resinosos (Ghisalberti, 1979). Uma vez coletado este material é enriquecido com secreções salivares e enzimáticas da própria abelha, sendo utilizado para cobrir as paredes da colméia, preencher frestas; como antibiótico e embalsamar possíveis insetos invasores (Bankova e col., 2000; Russo e col., 2004). Este produto tem sido utilizado há muitos anos na medicina tradicional do mundo inteiro e atualmente vem se destacando por apresentar propriedades biológicas interessantes, como atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante dentre outras (Marcucci e col., 2001; Alencar, 2002; Montpied e col., 2003, Cunha e col., 2004, Nagai e col., 2003; Aso e col., 2004; Ishikawa e col., 2004; Kumazawa e col., 2004, Khalil, 2006; Sforcin, 2007).

A própolis recolhida de uma colméia de abelhas espécie *Apis mellifera*, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra. A resina contida na própolis é coletada na vegetação próxima à colméia. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta (Salatino e col., 2005; Teixeira e col., 2005). Possivelmente, esta escolha está relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como anti-séptico (Sahinler & Kaftanoglu, 2005).

A composição química de uma própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (Kumazawa e col., 2004; Russo e col., 2004; Castro e col., 2007). Entretanto, a composição da própolis também varia sazonalmente em uma mesma localidade (Sforcin e col., 2000). Variações na composição também foram observadas entre amostras de própolis coletadas em uma mesma região, por diferentes raças de *A. mellifera* (Silici & Kutluca, 2005). Essa variação reflete também, nas propriedades farmacológicas e tóxicológicas das mesmas (Tavares, 2006).

A amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas regiões temperadas, devido à diversidade vegetal destas regiões: nas tropicais a diversidade vegetal é muito superior à diversidade observada nas regiões temperadas (Bankova, 2005).

Em países de clima temperado são poucas as plantas que produzem essa resina, mas no Brasil há uma grande variedade delas como a própolis verde ou marrom esverdeada, amarela, amarela escura, castanho escuro, castanho claro e, mais recentemente, a vermelha (Park e col., 2000; Trusheva e col., 2006). Própolis proveniente da Bulgária, Abânia, Egito revelaram atividade em testes microbiológicos contra fungos e bactérias Gram-positivas (Kujumgiev e col., 1999). Já a própolis proveniente de Cuba, mostrou ser um eficiente antioxidante além de atividade hepatoprotetora (Rodriguez e col., 1997). Foi também observado que o extrato etanólico da própolis Argentina apresenta interessante atividade antioxidante e antimicrobiana (Moreno e col., 2000). Própolis oriundas de países tropicais, Venezuela, Brasil e Argentina revelaram uma constituição química e atividades biológicas diferentes da própolis encontrada em países europeus e de outras partes do mundo (Marcucci, 1995; Negri e col., 2003; Pereira e col., 2003; Lima e col., 2009).

Os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteróides, cetonas, chalconas e di-hidrochalconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais (Marcucci, 1995; Park e col., 1996; Burdock, 1998; Bankova e col., 2000; Sahinler & Kaftanoglu (2005). Dos grupos de compostos, certamente o que mais vem chamando a atenção é o dos flavonóides (Havsteen, 2002). Os flavonóides são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (Beecher, 2003; Manach e col., 2004). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, entre elas apigenina, quercetina, rutina, luteolina, genisteína, daidzeína, antocianidina, kanferol etc. A presença e a concentração destes compostos é utilizada como índice de qualificação de amostras de própolis (Lu e col., 2004).

Essa classe de compostos expressa uma série de atividades biológicas incluindo ação antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica e anticâncer, além de inibir a peroxidação lipídica, agregação plaquetária, e inibir enzimas importantes do processo inflamatório como a ciclooxigenase e lipoxigenase (Viuda e col., 2008).

A origem botânica e química das própolis brasileiras tem sido ainda uma questão em aberto devido, principalmente, a diversidade de espécies vegetais para a retirada de resinas. Este enriquecimento reflete em uma necessidade atual de novas investigações com relação tanto a composição química como também, às propriedades biológicas das variedades de própolis encontradas em diferentes regiões do país.

Recentemente, a própolis brasileira foi classificada em 12 grupos, sendo verificadas diferenças qualitativas e quantitativas na composição química destes grupos de própolis,

pelas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas. Os grupos foram submetidos a uma avaliação antimicrobiana e os mais ativos foram os grupos 3 (RS); 6 (BA); 12 (MG) (Park e col., 2000; Alencar, 2002).

A própolis do grupo 6 (G6), proveniente do estado da Bahia, destacou-se por apresentar uma composição química distinta dos demais grupos, principalmente pela completa ausência de flavonóides. Recentemente, um composto foi isolado dessa própolis, e apresentou uma atividade antiproliferativa contra células tumorais HeLa bem como intensa atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, (Castro e col., 2009).

Outra variedade de própolis nunca antes relatada no Brasil, e denominada de “própolis vermelha”, proveniente do estado de Alagoas, tem demonstrado atividade antioxidante e antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos em ensaios preliminares *in vitro*, além de atividade antiproliferativa contra células tumorais HeLa, despertando um grande interesse pelo mercado japonês, sugerindo a necessidade de estudos detalhados sobre a sua composição química e propriedades biológicas. Dessa própolis também já foram isolados compostos que apresentaram intensa atividade antioxidante (Alencar e col., 2007; Oldoni, 2008) e antimicrobiana (Cabral, 2008).

Devido a esses resultados e, como parte de um projeto multidisciplinar, essas duas variedades de própolis foram selecionadas para um estudo complementar das atividades: antiproliferativa, antitumoral, antiinflamatória e antiulcerogênica. Essas atividades foram avaliadas no presente trabalho, tendo como colaboração, em paralelo, a identificação dos componentes químicos presentes nas própolis.

A identificação, de novos compostos provenientes das própolis em questão, poderá propiciar seu uso na indústria farmacêutica, gerando novas patentes brasileiras, o que conseqüentemente levará ao aumento do valor comercial deste produto, além de evitar que

empresas internacionais se aproveitem e se beneficiem de recursos naturais retirados ilegalmente do país, através da biopirataria.

Objetivos

Objetivos Gerais:

- ✓ Avaliar as atividades farmacológicas: Antitumoral, Antiinflamatória e Antiulcerogênica, de duas novas variedades de própolis: do grupo 6 (Bahia) e vermelha (Alagoas);
- ✓ Comparar as atividades farmacológicas citadas acima, entre as duas variedades de própolis de diferentes origens.

Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar a ação antiproliferativa dos extratos brutos, frações e compostos isolados dessas própolis e monitorar através dos testes de atividade antiproliferativa *in vitro*, o processo de isolamento e identificação dos compostos ativos;
- ✓ Comprovar a ação Antitumoral *in vivo* dos extratos brutos das própolis, através dos modelos de tumor de Ehrlich;
- ✓ Avaliar e comparar a atividade Antiinflamatória dos extratos brutos das própolis através dos modelos de edema de orelha induzido por óleo de cróton e edema de pata induzido por carragenina;
- ✓ Avaliar e comparar a atividade Antiulcerogênica dos extratos brutos das própolis através dos modelos de úlcera induzida por etanol e ligadura de piloro;

Capítulo 1

1- Introdução: Atividade Antiproliferativa e Antitumoral

1.1-Incidência do câncer

O câncer é a segunda causa de morte, superada somente pelas doenças cardiovasculares nas regiões mais desenvolvidas do mundo, podendo-se estimar que pelo menos um em cada cinco habitantes da Europa e América do Norte, irá morrer dessa doença. Acredita-se que em 2015 o câncer seja responsável por 9 milhões de mortes, em 2020, 30 milhões de pessoas sejam portadoras desta patologia e em 2030, 11,4 milhões de mortes no mundo (Grunfeld e col. 2004, Temal, 2005).

As estatísticas globais mostram que os cânceres de pulmão, estômago, fígado, colorectal, esôfago e próstata são os principais causadores de mortes em homens, e entre as mulheres, são os cânceres de mama, pulmão, estômago, colorectal e cervical. O principal responsável por óbitos é o câncer de pulmão, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Os cânceres de próstata, mama e cólon são mais observados em países desenvolvidos quando comparados a países em desenvolvimento, onde a maior incidência é de cânceres de fígado, estômago e cervical (WHO, 2006).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de

mama e de útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil observado mundialmente (INCA, 2009).

1.2-Aspectos Gerais do câncer

As causas do câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas. Esses fatores podem interagir de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações em células normais, levando a descontroles do seu ciclo celular e por esse motivo, o entendimento do funcionamento do mesmo é importante para compreender a etiologia do câncer (Li e col., 2006; Thiébaud e col., 2006; INCA, 2009).

A conversão de uma célula normal em tumoral bem como sua disseminação é acompanhada também pela remodelagem do estroma, onde células como macrófagos e fibroblastos liberam fatores solúveis (citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas) que influenciam o desenvolvimento da angiogênese tumoral (formação de novos vasos). A angiogênese é um processo complexo que representa uma etapa crítica na progressão tumoral, uma vez que promove o suprimento sanguíneo (oxigenação e nutrição) para o local contribuindo assim, para o crescimento do tumor bem como para sua disseminação (Folkman, 2003; Choi e col., 2005; Bianco e col., 2006; Nyberg e col., 2008).

1.3 -Tratamento do Câncer

Atualmente, a *quimioterapia* é, dentre as modalidades de tratamento, a que possui maior incidência de cura de muitos tumores incluindo os mais avançados e a que mais

aumenta a sobrevida dos portadores de câncer. São utilizados agentes químicos que interferem no processo de crescimento e divisão celular podendo ser usados tanto isolados como em combinação com a finalidade de eliminar células tumorais do organismo. São administrados pelas vias oral, intra-muscular, subcutânea, intra-venosa, intra-arterial, intratecal, intraperitoneal, intravesical, aplicação tópica e intra- retal, sendo a intravenosa a mais utilizada (Bonassa, 2005; Fonseca e col., 2000).

As drogas utilizadas nesse tratamento são classificadas de acordo com a especificidade no ciclo celular podendo ser ciclo celular específico e não específico. As primeiras são mais ativas no combate às células que se encontram em uma determinada fase do ciclo; já as ciclo celular não específica são letais às células em qualquer fase. Outra classificação é em relação a sua estrutura química e função em nível celular, descrito a seguir (Andrade & Silva, 2007).

Os *agentes alquilantes* causam alterações nas cadeias de DNA, impedindo sua replicação, sendo capazes de destruir células em repouso ou em processo de divisão ativa. Os mais comuns são ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatina, carboplatina (Andrade & Silva, 2007).

Os *agentes antimetabólitos*, estruturalmente semelhantes aos metabólitos naturais, atuam sobre células em fase de síntese do DNA, pois, incorporam-se a célula e, conseqüentemente, bloqueiam a produção das enzimas necessárias à síntese de substâncias fundamentais ou transmitem mensagens errôneas por se interporem às cadeias do DNA e RNA. Estão divididos em análogos das purinas (tioguanina, p.ex.), do ácido fólico (metotrexato), e das pirimidinas (fluorouracil, p.ex.) (Andrade & Silva, 2007).

Já os *antibióticos antitumorais* interferem na síntese dos ácidos nucléicos com conseqüente impedimento da duplicação e separação das cadeias de DNA e RNA

(doxorubicina, daunorubicina, bleomicina e mitoxantrona). As plantas agrupam os inibidores mitóticos (vincristina, vimblatina e o paclitaxel) e os inibidores da topoisomerase que é uma enzima necessária para o término da replicação do DNA (topotecano, etoposídeo e tenoposídeo). Por fim, os agentes múltiplos que possuem mecanismos de ação variados (procarbazina, hidroxiuréia, asparaginase) (Andrade & Silva, 2007).

Vê-se, portanto, que a quimioterapia é uma modalidade de tratamento sistêmica onde os agentes antineoplásicos são tóxicos a qualquer tecido de rápida proliferação, normais ou cancerosos, caracterizado por uma alta atividade mitótica e ciclo celular curto como células gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico e deste modo, tem como consequência o aparecimento de efeitos colaterais (Fonseca, 2000) como náuseas, lesão do epitélio intestinal, perda de cabelo (alopecia), esterilidade, teratogenicidade e susceptibilidade maior às infecções devido à redução da produção de leucócitos (Rang, 2004). Sendo assim, o uso clínico de um determinado quimioterápico exige que os benefícios sejam confrontados com a toxicidade, na procura de um índice terapêutico favorável (Oliveira e Alves, 2002).

Por esse motivo, torna-se evidente a necessidade de ensaios para a triagem de drogas menos tóxicas, mais seletivas e eficazes para o tratamento dessa doença, além de um melhor conhecimento do comportamento do tumor a ser tratado, envolvendo a biologia celular e molecular dos mesmos (Nam & Parang, 2003).

1.4- Produtos De Origem Natural e Atividade Antitumoral

Os quimioterápicos Etoposídeo, Vincristina, Vimblastina, Tenoposídeo e Paclitaxel foram introduzidos ao longo dos últimos vinte anos no tratamento do câncer, reforçando o interesse de indústrias farmacêuticas em produtos de origem natural (Viegas & Bolzani,

2006). Atualmente, um grande número de fitofármacos tem demonstrado ação anticâncer em diversos modelos experimentais através de alterações na via de transdução de sinais que modula a expressão gênica, a progressão do ciclo celular, proliferação e morte celular via apoptose (HemaIswarya & Doble, 2006; Schneider, 2009).

Na última década, quimioterápicos derivados de bactérias (Adriamicina), plantas (Lapachol, Taxol), organismos e microorganismos marinhos, entre outros, têm apresentado resultados bastante satisfatórios (Subramanian e col., 2006).

O tratamento de várias doenças utilizando como base produtos naturais é observado há muitos anos na medicina popular. Partindo desta tradição a utilização de medicamentos produzidos a partir de produtos naturais no tratamento do câncer tornou-se uma constante, confirmada pelo fato de 62% de drogas comercializadas para o tratamento do câncer entre 1983 e 1994 serem de origem natural (Ravelo e col., 2004; Cassileth, 2009).

A procura de novas drogas para o controle dos diversos tipos de neoplasias tem levado pesquisadores a isolar também compostos contidos em amostras de própolis de diferentes procedências (Burdock, 1998 e Banskota e col. 2001; Khalil, 2006; Ribeiro e col., 2006; Sforcin, 2007). Dentre os compostos isolados de diversos tipos de própolis que apresentaram atividades anticâncer promissoras destacam-se o ester fenetil do ácido cafeico (CAPE), e o artepelin C (3,5-diprenil-4- ácido hidroxicinâmico) cujos mecanismos de ação parecem estar relacionados respectivamente com a inibição de processos oxidativos que são considerados característicos da promoção do tumor (Burdock, 1998) e pela indução de apoptose em cultura de células tumorais (Kimoto e col., 2001).

Outro composto, a crisina, também isolada de própolis, mostrou-se efetiva em inibir o crescimento de culturas da linhagem de glioma de rato cujas células mantiveram-se estacionárias na fase G1 do ciclo celular (WENG e col., 2005). Ohta, 2008, verificou a ação

de uma variedade de própolis na inibição da angiogênese (neovascularização tumoral) através da indução de apoptose de células endoteliais em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A atividade *in vitro*, foi também comprovada *in vivo* para uma amostra de própolis solúvel em água utilizando linhagem celular de sarcoma murino 180 (S-180). Além de promover ação antiproliferativa *in vitro*, essa própolis inibiu significativamente o desenvolvimento do tumor por inibição da divisão celular e invasão das mesmas, *in vivo* (Inoue, e col., 2008).

Como citado anteriormente, as própolis do grupo 6 e vermelha também avaliadas nesse trabalho, demonstraram atividade antiproliferativa para células tumorais Hela e também intensa atividade antioxidante e antimicrobiana (Alencar e col., 2007; Oldoni, 2008; Castro e col., 2009).

Os diferentes mecanismos de ação apresentados acima refletem a importância da própolis, principalmente pela grande variedade de compostos presentes. Isso, aliado aos avanços na ciência, com relação à biologia molecular de tumores, bem como o desenvolvimento de ensaios *in vitro* e modelos experimentais de tumores *in vivo*, poderão auxiliar no estudo de substâncias com potencial anticâncer, com mecanismos envolvidos no processo de morte celular, angiogênese e metástases, sendo assim, diversos modelos experimentais têm sido propostos, buscando atender a esses objetivos.

Para os testes de atividade antiproliferativa *in vitro*, geralmente são utilizadas várias linhagens celulares tumorais com o intuito de se obter uma visão ampliada dos efeitos das drogas. Essas linhagens devem ser de cânceres originados de diferentes tecidos com diferentes origens embrionárias e com características morfológicas e fisiológicas distintas. Por isso, o painel escolhido pela Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/

UNICAMP, possui nove linhagens com células de diferentes tecidos humanos, cedidas do National Cancer Institute.

Quanto aos modelos de estudo *in vivo* para atividade anticâncer, o tumor de Ehrlich é um modelo de tumor murino, prático e transponível para a análise de efeitos antineoplásicos de diversos compostos. Esse tumor foi isolado de um adenocarcinoma mamário murino e pode se manifestar de duas maneiras, a forma ascítica (inoculação de células via intraperitoneal) ou a forma sólida (inoculação via subcutânea) (Nascimento e col., 2006).

2- Material e Métodos

A coleta das própolis, obtenção dos extratos brutos, fracionamento e identificação dos princípios ativos foram realizados através da colaboração com outros grupos de pesquisa: Depto. de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP), Faculdade de Odontologia de Piracicaba- FOP (UNICAMP), Universidade Federal de Alfenas e Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP).

2.1 - Coleta das Amostras

As amostras de própolis Vermelha e do Grupo 6 foram coletadas por raspagem das partes internas das caixas (melgueira e ninhos) de abelhas *Apis mellifera* da região litorânea da cidade de Maceió (Alagoas) e cidade Entre Rios (Bahia), respectivamente.

2.2 - Tratamento das Própolis Brutas

As amostras de própolis bruta foram limpas retirando-se a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer outro tipo de material estranho. Em seguida foram trituradas, peneiradas em peneiras de 18 “mesh”, homogeneizadas, pesadas e armazenadas a 5°C.

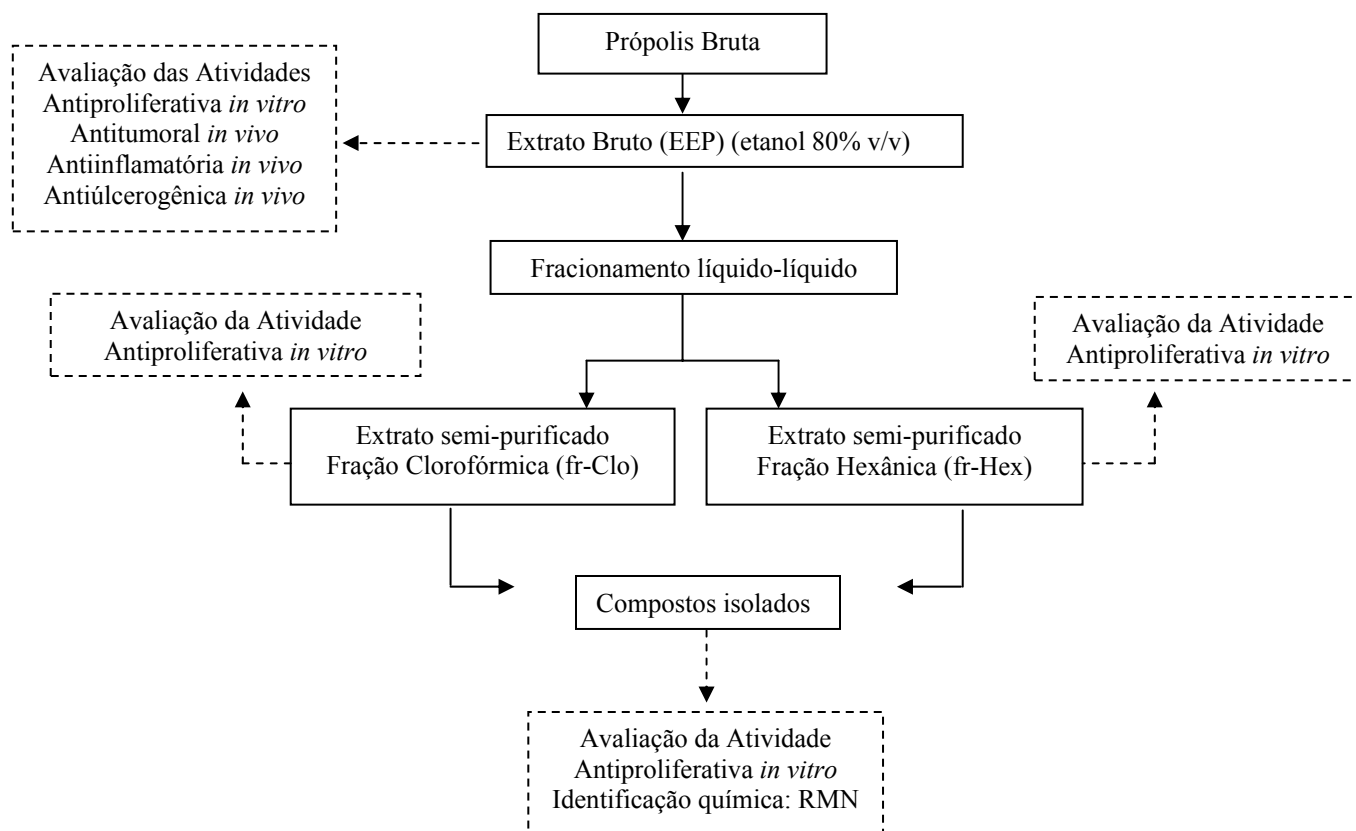
2.3 - Preparo dos Extratos Etanólicos

Para o preparo dos extratos etanólicos da Própolis Vermelha (EEPV) e da própolis do grupo 6 (EEG6) foram pesados 100 gramas de própolis triturada, obtidos conforme o item 2.2, e transferidos para tubos de centrifuga contendo 150 ml de etanol P.A (80%). A extração foi feita a 70°C, em banho termostatizado de água, por 30 minutos, sob agitação

constante. Em seguida, foi realizada uma filtração do extrato originando os EEPV e EEG6 utilizados posteriormente no fracionamento cromatográfico. Esses extratos foram encaminhados para a divisão de farmacologia e toxicologia do CPQBA para a realização dos ensaios preliminares: atividade antiproliferativa *in vitro* e ensaios *in vivo* das atividades Antitumoral, Antiinflamatória e Antiulcerogênica.

2.4 - Fracionamento dos Extratos Brutos Etanólicos da Própolis Vermelha (EEPV) e G6 (EEG6) (Fluxograma)

O Fracionamento dos extratos brutos está apresentado no fluxograma 1 para melhor compreensão. Tanto EEPV quanto EEG6, passaram pelo mesmo tratamento (Oldoni, 2007; Cabral, 2008; Castro, 2008).



Fluxograma 1: Ilustração do processo de obtenção dos extratos brutos etanólicos das própolis e seu fracionamento através de métodos cromatográficos.

2.5 - Avaliação da atividade Antiproliferativa in vitro dos Extratos Brutos

Frações e Compostos Isolados das Própolis Vermelha e G6

As linhagens celulares tumorais, utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI) dos EUA. Todas as linhagens foram enviadas congeladas para o laboratório do CPQBA, sendo então descongeladas e repicadas, quando necessário, sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco[®], Classe IIB2) e mantidas em frascos de 25cm² (T25) com 5 ml de RPMI-1640 /SFB e incubadas a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ em ambiente úmido. Para avaliação da atividade anticâncer foram utilizadas nove linhagens tumorais humanas apresentadas na Tabela 1.

2.5.1 - Plaqueamento de Células

No primeiro dia de experimento, foi realizado o plaqueamento de células em placas de 96 poços. Cada linhagem celular foi inoculada em uma placa, totalizando 9 placas. Em uma outra placa, a placa controle (T0), foram inoculadas todas as linhagens celulares. Após a tripsinização, já com as células em suspensão, foi feito a contagem das mesmas em Câmara de Neubauer. De acordo com a densidade de inoculação (DI) de cada linhagem (Tabela 1) foi calculada a quantidade de meio necessário para diluição das células. Feito isso, 100 µl de solução celular foram inoculados em placas de 96 poços sendo estas incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas nos testes de atividade anticâncer.

<i>Tipo Celular</i>	<i>Código</i>	<i>DI* (x 10⁴ células/ ml)</i>
Pulmão	NCI-460	4,0
Mama	MCF-7	6,0
Leucemia	K562	6,0
Ovário resistente **	NCI-ADR	5,0
Cólon	HT-29	4,0
Próstata	PC-O3	5,0
Melanoma	UACC-62	5,0
Ovário	OVCAR-03	7,0
Renal	786-0	4,5

* *DI: densidade de inoculação*, ** *Linhagem que expressa fenótipo de resistência a múltiplos fármacos.*

2.5.2 - Aplicação das Amostras

As amostras foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1g/ml resultando em soluções estoques. As amostras (100 µl) diluídas pelo menos 400 vezes em RPMI/SFB/gentamicina foram adicionadas em placas de 96 compartimentos nas concentrações 0,25; 2,5; 25; 250 µg/ml com exceção da T0 (Placa controle) que foi fixada, com a adição de 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% determinando assim, a quantidade de células presentes no momento em que as amostras foram colocadas.

As demais placas foram incubadas por 48 horas. Após este período, o experimento foi interrompido para a fixação das placas com a adição de 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para as células aderidas e 80% para as células em suspensão. Para completar a fixação celular, as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C e então submetidas a quatro lavagens consecutivas com água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários, sendo mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

2.5.3 - Ensaio de SRB (Sulforrodamina B)

O ensaio de SRB (Sulforrodamina B) avalia a **inibição de crescimento** celular por um método colorimétrico que estima indiretamente o número de células presentes corando o total de proteína celular utilizando o corante protéico SRB (Skehan e col., 1990)

As placas foram coradas pela adição de 50 µl de SRB a 0,4 % (peso/volume) dissolvido em ácido acético a 1 % e incubadas a 4 °C, por 30 minutos sendo então lavadas por 4 vezes consecutivas com uma solução de ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado por adição de 150 µl de Trizma Base (10µM). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi feita em um leitor de microplaca. (ELISA – Molecular Devices Versa Max Microplate Reader.).

2.5.4 - Análise dos Resultados

Os resultados de absorbância foram utilizados para construção de gráficos que relacionam a porcentagem de crescimento celular em função da concentração de amostra aplicada. Através da regressão sigmóide das curvas obtidas com as médias da porcentagem de crescimento, foram calculados os valores TGI (*total growth inhibition*), ou seja, concentração necessária para inibir totalmente o crescimento celular. Esses valores foram utilizados para comparar a potência das amostras e evidenciando a seletividade.

2.6.- *Ensaios in vivo*

2.6.1 - *Animais*

As avaliações das atividades farmacológicas dos extratos etanólicos foram realizadas em duas espécies de animais adquiridos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP e mantidos em ambientes com temperatura controlada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com fornecimento de água e ração comercial peletizada *ad libitum*. Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *SwissWebster* machos, adultos (25-40g) para os testes de atividade geral e antiinflamatória (edema de orelha), fêmeas da linhagem *Balb/c* (25-40g) para os ensaios de tumor de Ehrlich e ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* machos, adultos (120-250g) para os testes de atividade antiinflamatória (edema de pata) e antiulcerogênica. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório pelo período de sete dias, antes de serem submetidos aos procedimentos experimentais. Os protocolos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia (IB), UNICAMP, através dos protocolos: 1612-1; 1613-1; 1614-1; 1616-1; 1617-1; 1618-1 (em anexo).

2.6.2 - *Teste de Toxicidade Aguda*

A partir da realização desse teste, foram determinadas as doses tóxicas, letais e terapêuticas, dos extratos brutos etanólicos EEPV e EEG6, que foram utilizadas nos ensaios posteriores para avaliação das atividades antitumoral, antiinflamatória e antiulcerogênica *in vivo*.

Nesse teste, os EEPV e EEG6 foram injetados pela via intraperitoneal nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg em 6 grupos (n=5) de camundongos *SwissWebster*. Para injeção, os extratos foram diluídos com mistura de solução de NaCl 0,9% e polissorbato (tween 80) e em um animal, de cada grupo, foi injetado somente com o diluente. Os grupos foram observados continuamente por período de 4 horas e então diariamente, por período de 14 dias. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: sinais de toxicidade geral, como os efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades e mortalidade (Lapa *et al.*, 2008).

2.6.3 - Atividade Antitumoral: Tumor Ascítico de Ehrlich

O teste para avaliação do potencial antitumoral *in vivo* do EEPV e EEG6 foi realizado primeiramente no modelo de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) (Vicent & Nicholls, 1967). As células de TAE foram descongeladas, ressuspendidas em tampão fosfato salina (PBS) e centrifugadas por 5 minutos a 2500rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular novamente ressuspendido em PBS, em volume suficiente para que cada animal recebesse $1,0 \times 10^4$ células numa proporção em 0,5ml (via intraperitoneal). Dois animais receberam essas células e foram considerados doadores, e após sete dias foram sacrificados por deslocamento cervical, seu líquido ascítico foi coletado e submetido a processamento, dado que a quantidade celular agora era muito maior que a inoculada.

Para 2ml de líquido ascítico coletado foram adicionados 2ml de ficoll (Amersham Pharmacia[®], Uppsala, Sweeden) e a mistura centrifugada a 2500rpm por 15min a 18°C. O anel celular formado foi coletado e submetido à nova centrifugação, nas mesmas condições, mas ressuspendido em PBS. O sobrenadante foi descartado e o precipitado livre de

hemáceas e células brancas foi ressuspensionado em solução de NaCl 0,9%, em quantidade suficiente para a inoculação de $1,0 \times 10^5$ células/0,5ml em cada animal.

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=10) e tratados respectivamente: solução de NaCl 0,9% (veículo) como controle negativo, doxorrubicina (5 mg/kg) como controle positivo, EEPV e EEG6 nas doses de 200 e 90 mg/kg (doses determinadas pelo teste de toxicidade aguda) respectivamente. O tratamento foi iniciado no terceiro dia pós-inóculo, sempre pela via intraperitoneal, sendo realizado a cada 3 dias.

Diariamente, os animais foram analisados através de observação e pontuados segundo a Tabela 2, na qual foram verificados sinais físicos, clínicos e comportamentais. Se algum animal obtivesse 14 pontos, o mesmo era eutanasiado por deslocamento cervical e a necropsia realizada, segundo protocolos que seguem os direitos internacionais dos animais (Ullman-Cullere & Foltz, 1999).

Tabela 2. Quesitos Observados para Avaliação Diária do TAE.

QUESITO	OBSERVAÇÃO	PTS
Aparência	Normal	0
	Pelos sem brilho, orelhas normocoradas.	1
	Ligeira Piloereção, orelhas ligeiramente pálidas.	2
	Piloereção, postura encurvada, orelhas pálidas.	3
Sinais Clínicos	Temperatura, frequência cardíaca e respiração normais.	0
	Discretas alterações, abdômen ligeiramente dilatado.	1
	Moderada dilatação do abdômen	2
	Acentuada dilatação do abdômen, dispnéia.	3
Comportamento Espontâneo	Normal	0
	Ligeiras alterações	1
	Menos móvel e alerta, isolado.	2
	Vocalização, hiperatividade/ imóvel, letárgico.	3
Comportamento Provocado	Normal	0
	Ligeira depressão ou resposta exacerbada	1
	Alterações moderadas	2
	Reações violentas/ muito fracas e precomatosas	3
Ajuste de Pontuação	Se for registrado 3 mais de uma vez, marcar um ponto adicional para cada 3.	2-4
TOTAL	< 14 pontos – sobrevida/ ≥ 14 pontos – eutanásia (deslocamento cervical)	

2.6.4 - Atividade Antitumoral :Tumor Sólido de Ehrlich (Dorso)

As células foram obtidas como no item 2.6.3. Foram inoculadas 1×10^5 células / animal, por via subcutânea, na região antero-dorsal. Os animais foram separados em 4 grupos (n=10) e tratados após 5 dias do inóculo respectivamente: NaCl 0,9% (veículo) como controle negativo, doxorubicina (5 mg/kg) como controle positivo, EEPV e EEG6 nas doses de 200 e 90 mg/kg a cada 3 dias durante quinze dias. Os animais foram eutanasiados, o tumor retirado, pesado e medido. A estatística foi realizada através da análise de variância ANOVA seguido do teste de Duncan.

2.6.5 - Atividade Antitumoral :Tumor Sólido de Ehrlich (Pata)

Inicialmente, os animais foram pesados e o volume basal de sua pata traseira direita foi mensurado em aparelho de hidropletismômetro. As células, obtidas como no item 2.6.3, foram diluídas em tampão fosfato-salina (PBS) e inoculadas no coxim plantar da pata traseira direita dos camundongos, na densidade de 1×10^6 / animal. Após 24 horas, os animais foram divididos em 4 grupos (n=10) e tratados respectivamente: NaCl 0,9% (veículo) como controle negativo, doxorubicina (5 mg/kg) como controle positivo, EEPV (50, 100 e 200 mg/kg) e EEG6 (90 mg/kg). Os tratamentos foram feitos a cada três dias, bem como a determinação da variação do volume das patas traseiras direitas (hidropletismômetro) e o peso corporal dos animais. No 16º dia de teste, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e suas patas traseiras foram retiradas e pesadas (Verçosa Junior *e col.*, 2007; Nascimento *e col.*, 2006). Dessa forma, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- ❖ *Variação do volume da pata traseira direita, tendo como controle o volume basal antes da indução do tumor;*
- ❖ *Peso relativo do tumor, descontando-se o peso da pata sadia e dividindo-se pelo peso corporal;*

A estatística foi realizada através da análise de variância ANOVA seguido do teste de Duncan.

3 - Resultados

3.1 - Avaliação da atividade Antiproliferativa in vitro dos Extratos Brutos,

Frações e Compostos Isolados das Própolis Vermelha e G6

Para análise dos resultados, foram calculadas as médias das absorbâncias dos compartimentos contendo células + amostras descontando-se seus respectivos brancos (compartimentos contendo apenas amostra). Já a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

Se $T_A > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular

Se $T_A \geq T_0 < T_1 \rightarrow$ atividade citostática: $\%C = 100 \times [(T_A - T_0) / (T_1 - T_0)]$

Se $T_A < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T_A - T_0) / T_1]$

Onde:

T_A = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

T_1 = absorbância do branco de células

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Com esses valores, foram elaborados gráficos relacionando a porcentagem de crescimento com a concentração da amostra teste (Figuras 1-10), tendo-se como controle positivo o quimioterápico doxorrubicina. Os valores na faixa entre 50 e zero representam inibição de crescimento (atividade citostática), sendo que os valores que atingem o zero representam inibição total de crescimento (TGI – total growth inhibition). Os valores negativos representam morte celular (atividade citocida), pois a quantidade de células

(aferida pela absorbância no final do experimento), nesse caso, é menor da que iniciou o experimento (absorvância do T₀).

3.1.1 - Doxorubicina

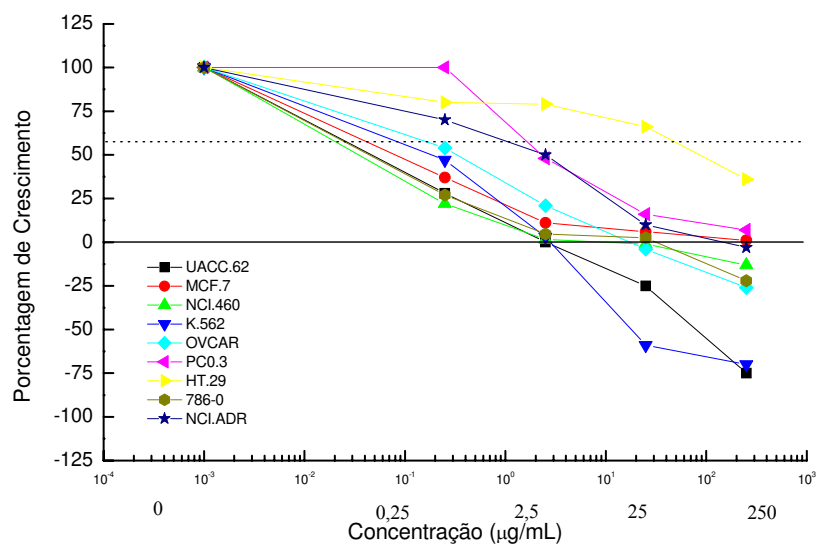


Figura 1. Curva concentração-resposta da droga doxorubicina (controle positivo) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de droga utilizada.

3.1.2 - *Propolis Vermelha*

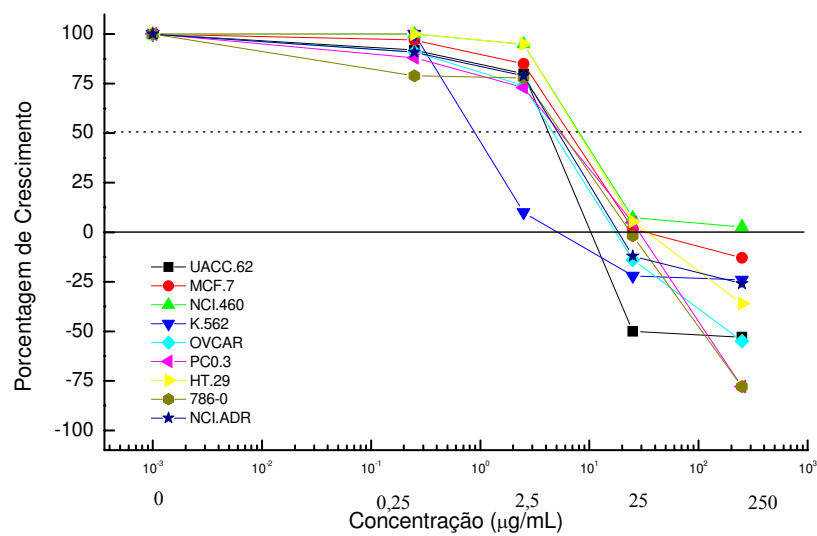


Figura 2: Curva concentração-resposta do EEPV sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

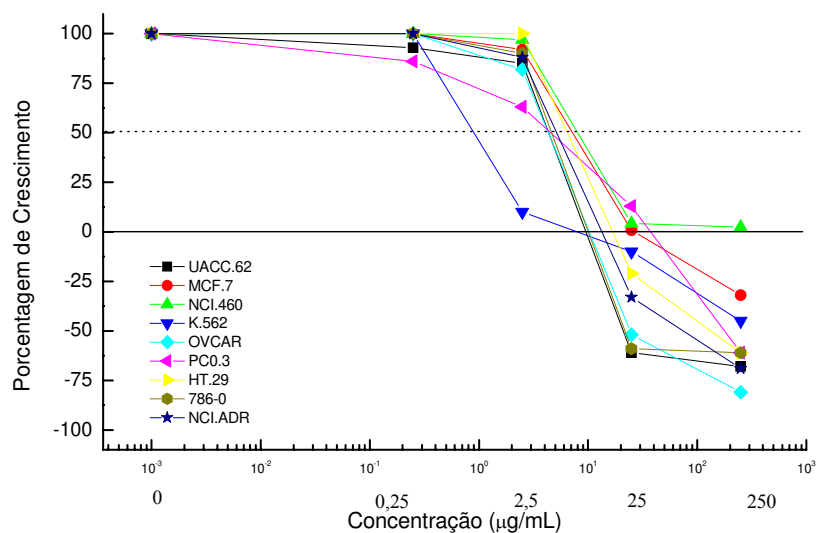


Figura 3: Curva concentração-resposta da fração hexânica do EEPV (fr-Hex) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

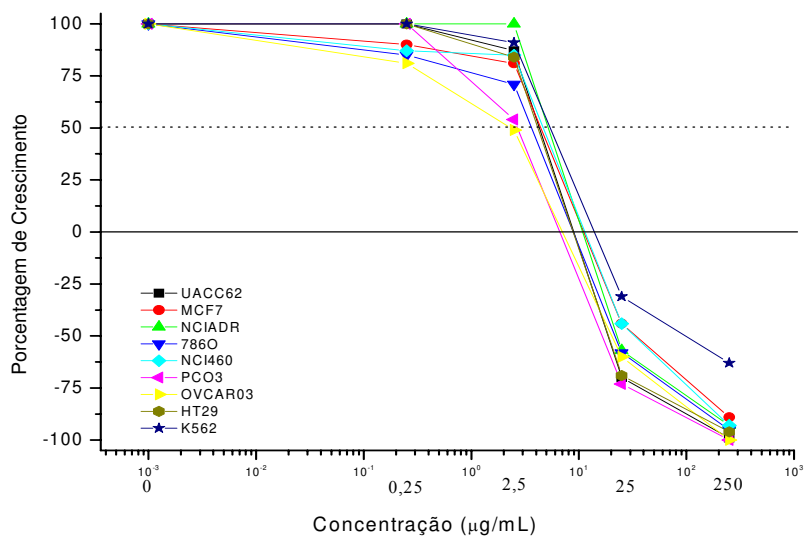


Figura 4: Curva concentração-resposta do composto puro da fração hexânica (C1) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

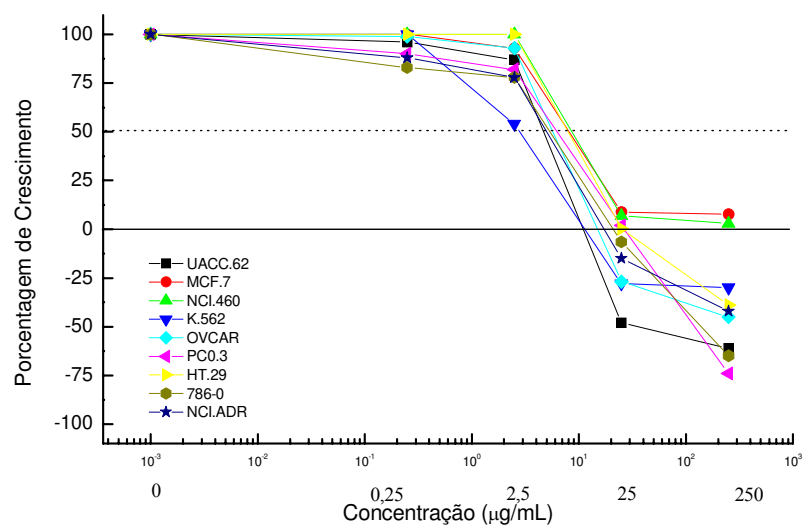


Figura 5: Curva concentração-resposta da fração clorofórmica do EEPV (fr-clo) sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

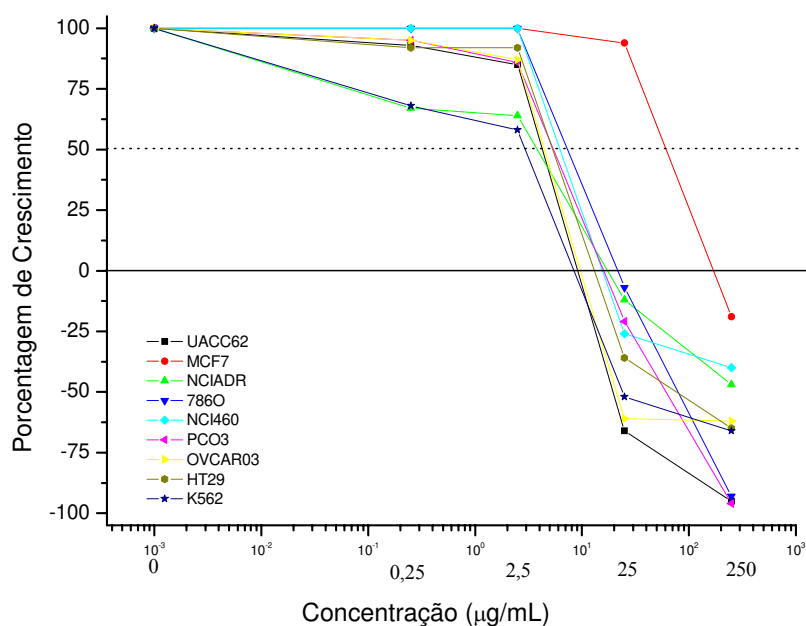


Figura 6: Curva concentração-resposta do composto puro da fração clorofórmica C2, sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração da fração utilizada.

Na figura 1, vê-se que a doxorrubicina apresentou atividade citostática (abaixo de 50%) para as linhagens de pulmão (NCI-460), renal (786-0) melanoma (UACC-62) leucemia (K-562), Ovário (OVCAR-03) e mama (MCF-7). Na concentração de 2,5µg/ml para todas as linhagens com exceção de cólon (HT-29). Nas maiores concentrações, 25µg/ml e 250µg/ml o controle foi citotóxico (abaixo de zero) para todas as linhagens com exceção de ovário resistente (NCI-ADR), cólon e próstata (PC-03).

O EEPV (figura 2) revelou uma atividade antiproliferativa para a linhagem de leucemia, melanoma, ovário, ovário resistente e renal na concentração de 25µg/ml. Na concentração de 250µg/ml foi antiproliferativa para todas as linhagens com exceção da linhagem de pulmão.

A fr-hex (figura 3) apresentou maior potência para a maioria das linhagens enquanto que C1 (figura 4) foi ainda mais potente. Este último apresentou atividade antiproliferativa para todas as linhagens já na concentração de 25µg/ml aumentando sua potência na concentração maior.

A fr-clo (figura 5) foi antiproliferativa para todas as linhagens a partir de 25 µg/ml com exceção de mama e pulmão. Já C2 (figura 6), foi também resistente para mama mas citotóxico para pulmão.

Os valores de TGI (inibição total do crescimento) para doxorrubicina, EEPV, fr-hex, fr-clo e C1 e C2 podem ser vistos na tabela 4.

Tabela 4. Valores de TGI (µg/ml) para Doxorrubicina, (EEPV), Fração hexânica (fr-hex), (C1), Fração clorofórmica (fr-clo) e C2 na avaliação de antiproliferativa *in vitro*.

<i>Linhagens</i>	<i>DOX</i>	<i>EEPV</i>	<i>Fr-hex</i>	<i>C1</i>	<i>Fr-clo</i>	<i>C2</i>
K-562	2,4	14,0	17,2	17,1	23	8,7
OVCAR-03	21,2	23,7	11,0	6,5	23,9	11,0
786-0	14,4	23,2	11,0	9,2	24,6	23,2
PC0-3	180	25,5	31,0	6,2	27,1	18,0
HT-29	>250	52,3	21,2	9,7	46,1	15,6
NCI-460	15,0	148,2	140,0	13,1	150,2	27,4
MCF-7	57,0	79,5	51,0	12,5	182,7	198
NCI-ADR	116,1	42,3	15,3	16,3	29,1	23,3
UACC-62	2,5	12,3	10,0	10,3	12,8	10,2

Através dos valores obtidos, pode-se afirmar que a fr-hex obtida do EEPV aumentou a atividade específica para algumas linhagens (OVCAR-03, 786-0, HT-29 e NCI-ADR) em pelo menos duas vezes. Já o composto C1, oriundo dessa fração, aumentou a atividade específica para OVCAR-03, PC-03, HT-29 e NCI-460 e MCF-7. A fr-clo produziu efeito semelhante ao EEPV e o composto C2, aumentou a atividade específica para K-562, OVCAR-03, HT-29 e NCI-460.

3.1.3 - *Própolis G6*

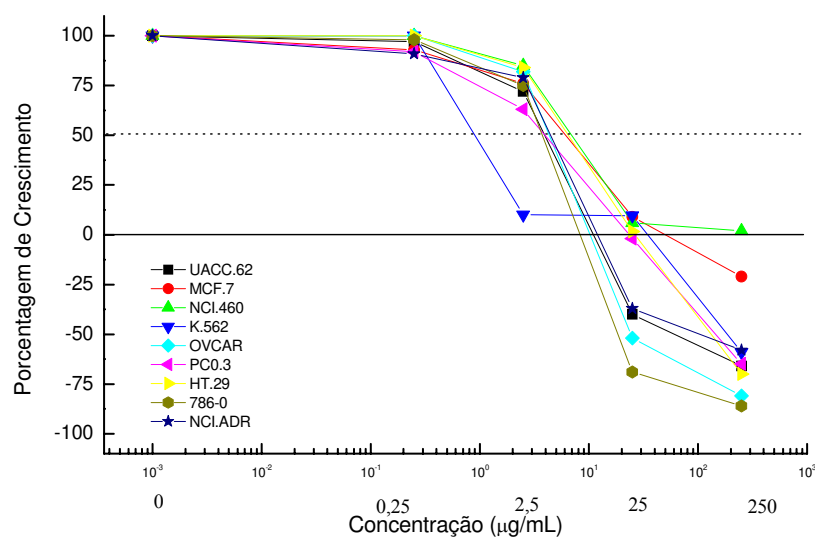


Figura 7: Curva concentração-resposta do EEG6 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

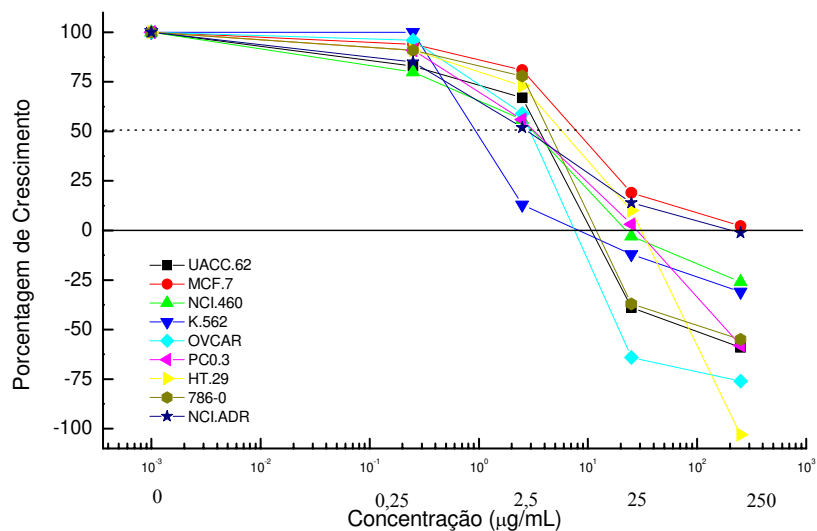


Figura 8: Curva concentração-resposta da fração hexânica do EEG6 sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

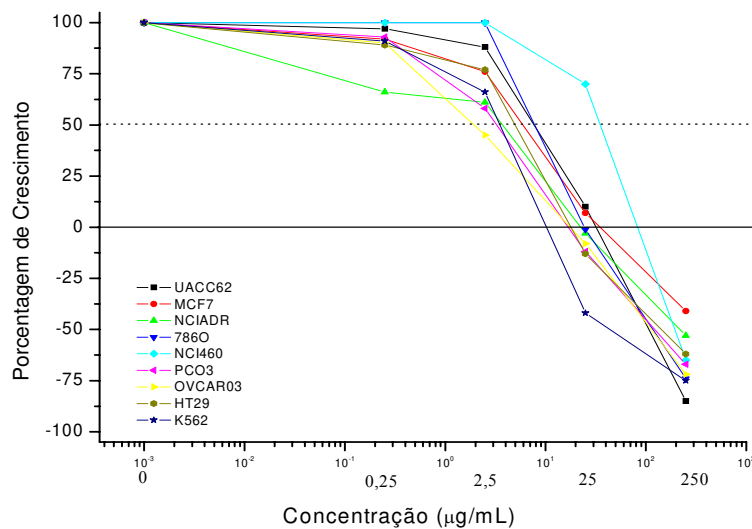


Figura 9: Curva concentração-resposta do composto C3 da fr-hex sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração do extrato utilizado.

O EEG6 demonstrou atividade antiproliferativa para melanoma, ovário resistente, ovário e renal na concentração de 25µg/ml. Para 250µg/ml a amostra foi antiproliferativa para todas as linhagens com exceção da linhagem de pulmão. A fr-hexG6, nessas duas concentrações não apresentou atividade para ovário resistente e mama. Já C3, na última concentração, foi citotóxico para todas as linhagens.

Os valores de TGI para EEG6, fr-hexG6 e C3 estão descritos na tabela 5. De uma maneira geral, o fracionamento do extrato bruto EEG6 não forneceu frações ou princípios ativos com melhor perfil de atividade, quando comparado à própolis vermelha.

Tabela 5. Valores de TGI ($\mu\text{g/ml}$) para Doxorrubicina, (EEG6), Fração hexânica (fr-hexG6), Fração clorofórmica (fr-cloG6) e composto isolado C3.

<i>Linhagens</i>	<i>DOX</i>	<i>EEG6</i>	<i>Fr-hex</i>	<i>C3</i>
K-562	2,4	17,2	19,3	11,3
OVCAR-03	21,2	11,6	7,6	16,0
786-0	14,4	8,5	15,7	27,3
PC0-3	180	23,7	26,2	18,5
HT-29	>250	28,0	26,8	22,6
NCI-H460	15,0	138,0	41,3	84,4
MCF-7	57,0	70,2	179,0	43,7
NCI-ADR	116,1	15,3	134,0	24,0
UACC-62	2,5	13,0	13,2	29,5

3.2 - Estruturas químicas dos compostos isolados

O processo de fracionamento dos extratos EEPV e EEG6 e isolamento dos compostos C1, C2 e C3 foram descritos por Alencar *et al.*, 2007; Oldoni, 2008; Cabral, 2008 e Castro 2009. As estruturas químicas dos compostos isolados estão representadas nas figuras 10, 11 e 12.

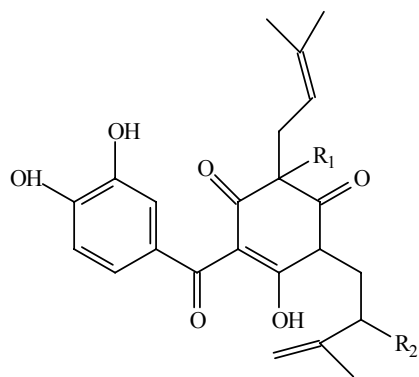


Figura 10 – Estrutura Química do composto C1 identificado como uma benzofenona prenilada, isolado da fração hexânica oriunda do EEPV.

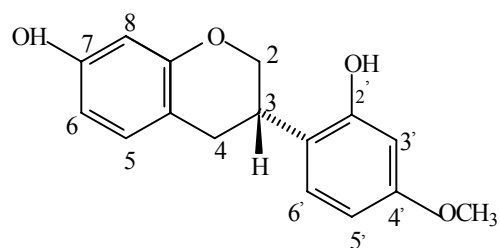


Figura 11 - Estrutura Química do composto C2, identificado como 2', 7-dihidroxi- 4' metoxiisoflavana – vestitol, isolado da fração clorofórmica oriunda do EEPV.

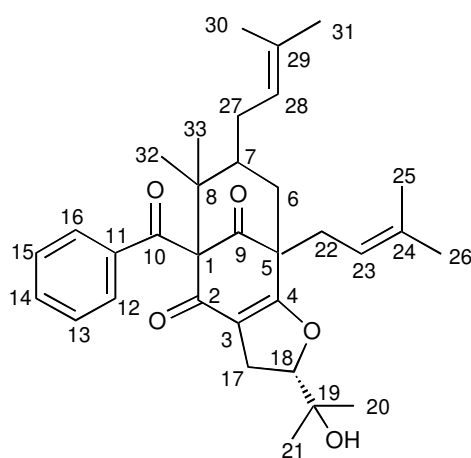


Figura 12 - Estrutura Química do composto C3, identificado como hyperibona A, isolado da fração hexânica oriunda do EEG6.

3.3 - Ensaios in vivo

3.3.1 - Teste de Toxicidade Aguda

Os extratos etanólicos EEPV e EEG6 foram administrados via intraperitoneal nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. O EEPV demonstrou toxicidade a partir da dose de 300mg/kg. Os animais nessa dose diminuíram seu comportamento exploratório, apresentaram sonolência e morreram após alguns dias e na dose maior (1000mg/kg), houve morte de 50% dos animais no primeiro dia, sendo que todos morreram dias depois. Já para o EEG6, a toxicidade ocorreu a partir de 100mg/kg. As doses de 300 e 1000mg/kg, provocaram convulsão nos animais, seguido de morte.

Após quinze dias, a dose letal para 50% dos animais (DL_{50}) foi calculada através de regressão linear resultando em 200mg/kg para EEPV e 90mg/kg para EEG6.

3.4 - Atividade Antitumoral In Vivo

3.4.1 - Tumor Ascítico de Ehrlich

Esse modelo foi utilizado para avaliar a atividade dos extratos EEPV e EEG6 no aumento de sobrevida dos animais tratados com esses extratos. O tempo médio de sobrevida (**MST**) em dias e a porcentagem de aumento de sobrevida (**ILS%**) foram calculados segundo as equações: $MST = 1^{\circ} \text{dia de morte} + \text{último dia de morte} / 2$; sendo MST_c (controle) e MST_t (tratado); $ILS\% = ((MST_t - MST_c) / MST_c) \times 100$ (Plowman e col, 1995).

Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Valores do tempo médio de sobrevida (*MST*) e a porcentagem de aumento de sobrevida (*ILS%*) da Doxorubicina, EEPV (200mg/kg) e EEG6 (90mg/kg).

<i>Grupos</i>	<i>MST(dias)</i>	<i>MST%</i>	<i>ILS%</i>
<i>Salina (NaCl 0,9%)</i>	13	--	
<i>Doxurubicina</i>	39,5	303	203
<i>EEPV</i>	32	204	146
<i>EEG6</i>	13	100	0

Os valores de MST apresentado para o EEPV foi semelhante ao controle Doxorubicina. Os animais tratados com EEG6 foram comprometidos pela alta toxicidade desse extrato, uma vez que foram submetidos a tratamentos a cada 3 dias, sendo sacrificados junto com o grupo controle, não apresentando portanto sobrevida.

3.4.2 - Tumor Sólido de Ehrlich (Dorso)

Esse experimento foi realizado com a finalidade de avaliar a ação sistêmica dos extratos brutos: EEPV e EEG6. As amostras foram comparadas estatisticamente através do teste de Duncan, sendo comparadas com o controle negativo (solução de NaCl 0.9%). Usando o parâmetro peso relativo (p/g) (peso tumor/peso animal), o grupo tratado com doxorubicina, controle positivo, apresentou um $p=0,00032\pm0,0008$, enquanto que o grupo salina apresentou um $p=0,0024\pm0,003$ comprovando a efetividade do teste. Ao comparar as amostras de EEPV e EEG6 nas doses de 200 e 90 mg/Kg foi obtido um $p=0\pm0$ e $p=0,0003\pm0,0007$ respectivamente. Vale ressaltar que 100% dos animais do grupo tratado com EEPV não apresentaram crescimento tumoral (figura 13).

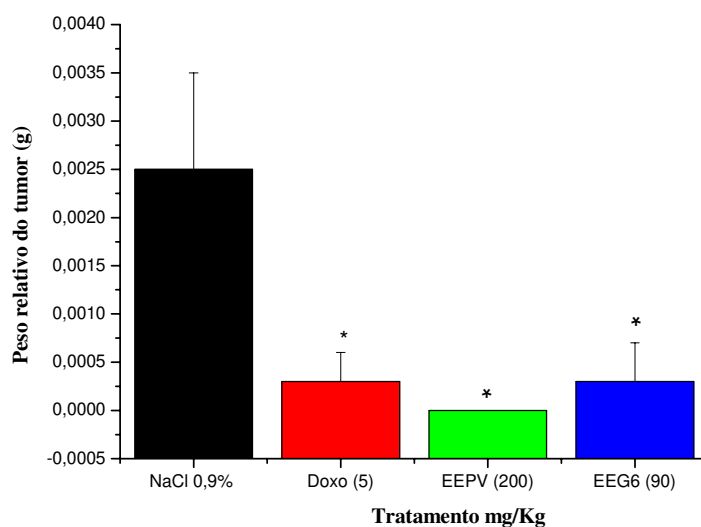


Figura 13: Peso relativo do tumor em relação ao peso corporal nos diferentes grupos.

* $p < 0,001$, em relação ao grupo salina (NaCl 0,9%). (ANOVA).

3.4.3 - Tumor Sólido de Ehrlich (Pata)

Comprovada a atividade antitumoral em especial do EEPV, um novo ensaio foi realizado, agora com 3 doses de EEPV (50, 100 e 200mg/Kg) e apenas 1 dose para G6 (50mg/kg), a fim de comprovar sua atividade, uma vez que sua ação não havia sido significativa por apresentar toxicidade. Os resultados foram expressos nas figuras 14 e 15.

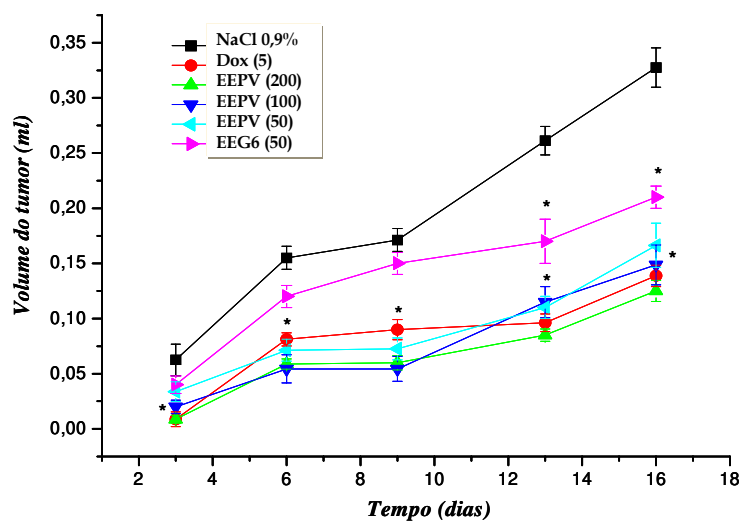


Figura 14: Gráfico representativo do volume do tumor pelo tempo para diferentes tratamentos. * $p<0,001$, em relação ao grupo salina (NaCl 0,9%) (ANOVA).

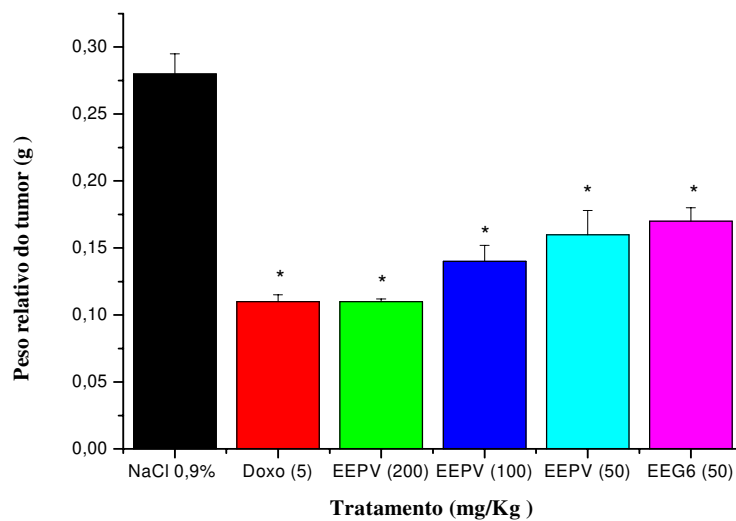


Figura 15: Gráfico representativo do peso da pata / tumor em relação ao peso corporal nos diferentes tratamentos. * $p<0,001$, em relação ao grupo salina (NaCl 0,9%) (ANOVA).

As figuras 14 e 15 comprovam a potente ação antitumoral do EEPV. A figura 14 representa a variação do volume do tumor durante os dias de experimentação (T3, T6, T9, T13 e T16 dias). O acompanhamento do volume tumoral demonstrou que 3 dias após a inoculação (T3), houve uma diferença estatística significativa nas doses de 100 e 200mg/kg mas não para dose de 50mg/kg, entretanto nas medições T6, T9, T13 e T16, todas as doses foram significativamente ativas, apresentando o mesmo perfil da doxorubicina (quimioterápico controle). O EEG6 demonstrou atividade significativa apenas nas duas últimas medições, não havendo portanto a necessidade da realização de uma curva dose-resposta.

A figura 15 mostra o peso da pata com tumor em relação ao peso corporal retiradas no final do experimento após eutanásia dos animais. Os resultados corroboram com os dados de volume tumoral (Figura 14), o peso relativo tumoral (peso do tumor/peso animal) foi de $28 \pm 1,5$ para o controle negativo, $11 \pm 0,5$ para a doxorubicina, $11,8 \pm 0,2$ para EEPV (200mg/kg), $14,2 \pm 1,2$ para EEPV (100mg/kg), $16 \pm 1,8$ para EEPV (50mg/kg), em $(g)10^{-3}$, sendo esses pesos estatisticamente diferentes do controle negativo. Como EEG6 (50mg/kg) inibiu o desenvolvimento final do tumor também foi considerado diferente estatisticamente, uma vez que o tumor teve um desenvolvimento acentuado nas últimas medições para o controle negativo, apresentando um peso relativo de $17 \pm 1,08$.

4 - Discussão

Atualmente várias propriedades biológicas têm sido atribuídas à própolis e devido a isso, este "remédio natural" como citam alguns autores, tem se tornado um ponto particular de grande interesse (Castaldo & Capasso, 2002; Khalil, 2006). Estudos científicos evidenciam que a própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente, em relação às atividades antiinflamatória, antimicrobiana, antineoplásica e antioxidante (Keiko, 2004; Viuda e col., 2008). Sendo assim, o melhor conhecimento de suas propriedades visa, além da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, a agregação de valor econômico à própolis bruta, a fim de gerar uma fonte econômica de exploração agrícola e extrativismo autosustentável (Menezes, 2005).

Os ensaios relacionados à atividade antiproliferativa e antitumoral foram iniciados com os extratos brutos etanólicos da própolis vermelha (EEPV) e G6 (EEG6). Ambos os extratos apresentaram antiproliferativa *in vitro* com perfil semelhante de ação, sobre as células tumorais. Além disto, os valores de TGI (tabelas 4 e 5) indicaram que a linhagem de pulmão (NCI-460) apresentou resistência aos dois extratos.

A atividade e seletividade de uma nova droga são avaliadas através de uma triagem que utilizam vários ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, definindo assim seu perfil farmacológico. Os testes de atividade antiproliferativa *in vitro*, os quais direcionam a pesquisa para moléculas com tal potencial de ação sobre células neoplásicas em cultura, são os mais amplamente utilizados (Holbeck, 2004; Skehan e col., 1990). Esse tipo de análise, por ter condições de avaliar grande número de substâncias em pouco tempo, aumenta a possibilidade de descoberta de novas drogas anticâncer. Além disso, é uma técnica

relativamente simples, barata, reproduzível e, ainda, providencia um provável mecanismo de ação da droga (Suggitt e col., 2005).

Comprovada a atividade do EEPV e EEG6 *in vitro*, foi dado início aos ensaios *in vivo*, a fim de se verificar a atividade antitumoral em modelos experimentais com animais uma vez que a atividade antiproliferativa sobre células tumorais observada em modelos *in vitro*, nem sempre reproduz a mesma ação *in vivo*. Nesse modelo, as informações sobre a farmacocinética e farmacodinâmica da droga em estudo são obtidas, enquanto em testes *in vitro* isso não é possível. Portanto, o estudo combinado desses dois modelos é muito indicado para uma conclusão mais definitiva a respeito da atividade de uma nova substância com potencial anticâncer (Smith e col., 2005).

Antes de iniciar os ensaios *in vivo* foram calculadas as doses ideais dos EEPV e EEG6 através de um teste de toxicidade aguda. Para o EEPV, a dose de 1000mg/kg causou sonolência, diminuição da atividade motora, e resposta a estímulos. Alguns indivíduos morreram após 1 hora. A dose de 300mg/kg, inicialmente provocou quadro semelhante mas os indivíduos morreram somente após alguns dias. A dose de 100mg/kg não provocou alterações.

A administração das doses do EEG6 provocou reações diferentes daquelas observadas na administração do EEPV. A dose de 1000mg/kg provocou morte rápida dos animais. Essa dose causou agitação nos animais, alteração no comportamento e na respiração, tremores seguidos de espasmos musculares e convulsões. Todos os animais tratados com essa dose morreram em poucos minutos. Em doses menores foi observado quadro semelhante com maior latência.

O teste de toxicidade aguda revelou diferentes respostas de toxicidade para os dois extratos brutos avaliados. Isso mostra que apesar de ser considerado como um "remédio

natural", própolis de diferentes origens e regiões devem ser avaliadas quanto à sua composição química e atividades biológicas antes da sua comercialização, para não causar danos à população usuária.

Devido à toxicidade encontrada para ambos os extratos, a partir de 300mg/kg para EEPV e 100mg/kg para EEG6, foram determinadas as doses para uso nos ensaios seguintes: 200mg/kg para EEPV e 90mg/kg para EEG6 (DL₅₀).

Os extratos EEPV (200mg/kg) e EEG6 (90mg/kg) foram então avaliados quanto a atividade antitumoral *in vivo* nos modelos de tumor ascítico e sólido (dorso e pata) de Ehrlich. Inicialmente essa atividade foi avaliada nos modelos de tumor ascítico a fim de verificar a ação local de EEPV e EEG6, bem como o aumento de sobrevida dos animais tratados com os mesmos. As células de Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), foram inoculadas via i.p., em cada animal e os mesmos foram tratados a cada 3 dias durante 60 dias de experimento. Diariamente, os animais foram avaliados quanto ao estado clínico e comportamental recebendo uma pontuação (de 1 a 14). Caso algum animal obtivesse 14 pontos, o mesmo era eutanasiado por deslocamento cervical segundo protocolos que seguem os direitos internacionais dos animais (Ullman-Cullere & Foltz, 1999).

O tempo médio de sobrevida (MST%) e a porcentagem de aumento de sobrevida (ILS%) foram calculados segundo as equações: $MST\% = \frac{1^\circ \text{dia de morte} + \text{último dia de morte}}{2} \times 100$; sendo MSTc (controle) e MSTt (tratado); $ILS\% = \frac{(MSTt - MSTc)}{MSTc} \times 100$. Os animais tratados com EEPV apresentaram um MST% de 204% e um ILS% 146% contra um MST% de 303% e um ILS% 203% dos animais tratados com doxorubicina, usado como controle positivo. ***De acordo com critérios do NCI (National Cancer Institute), citado por Orsolic, (2005) e Gupta (2004): $MSTt/MSTc\% > 125\%$ e $ILS > 25\%$ é um indicativo de que a substância avaliada possui ação antitumoral significativa.***

Os animais tratados com EEG6 não apresentaram sobrevida e ainda foram comprometidos pela elevada toxicidade dessa amostra (já descrita). Apesar da dose administrada, ser inferior àquela considerada tóxica, os animais foram tratados a cada 3 dias, o que pode ter potencializado essa toxicidade, levando os animais ao sacrifício juntamente com o grupo salina (controle) no 16º dia de experimento.

A implantação do tumor ascítico de Ehrlich induz uma reação inflamatória local, com aumento da permeabilidade vascular que resulta na formação do edema, migração celular e formação progressiva do líquido ascítico. A formação do fluido ascítico é essencial para o crescimento do tumor, afinal seus constituintes servem de fonte nutricional para as células tumorais (Fecchio *e col.*, 1990; Nascimento *e col.*, 2006).

Sendo assim, a atividade antitumoral do EEPV foi confirmada através do aumento na sobrevida dos animais tratados; os compostos ativos provavelmente agiram nas células tumorais impedindo que os animais desenvolvessem a neoplasia ou uma sobrevida menor (Lobo *e col.*, 2000). Além desse efeito citotóxico local sobre as células tumorais, semelhante ao encontrado no ensaio *in vitro*, esse extrato pode ter tido uma ação local indireta, relacionada a um efeito antioxidante, descrito por Alencar, (2007) ou mesmo através de uma ação antiinflamatória como demonstrado na sequência deste estudo.

Segundo Alencar *e col.*, (2007) a própolis trata-se de um extrato rico em flavonóides, uma classe de compostos antioxidantes potentes, a qual pode ter combatido os efeitos provocados pelo desenvolvimento do tumor ou mesmo, ter atuado na prevenção do desenvolvimento do mesmo, uma vez que os animais foram tratados 3 dias após o inóculo do tumor. A prevenção do desenvolvimento de tumores através do consumo de produtos ricos em polifenóis, em especial flavonóides, é um assunto bastante discutido e comprovado cientificamente, devido à elevada ação antioxidante desses compostos (Amin,

2009; Yang, 2009). Esses compostos atuam de forma a reduzir a ação de radicais livres no organismo, liberados intensamente durante o desenvolvimento de tumores (Kohchi, 2009, Sforcin, 2007).

A atividade antioxidante desses compostos é principalmente devida às suas propriedades de óxido redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio tripleto e singlete ou decompondo peróxidos (Degáspari, 2004). Dessa forma, os flavonóides demonstram grande eficiência no combate de vários tipos de moléculas oxidantes, que estão envolvidos em danos no DNA e promoção de tumores (Bravo, 1998; Marchand, 2002). Quimicamente esses compostos são doadores de elétrons e acabam por reagir, inativar e estabilizar os radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (Birt, 2001). Após esse processo, os radicais livres perdem sua reatividade e não são capazes de atacar as diferentes biomoléculas do organismo (HEIM, 2002).

Ainda com relação à própolis, alguns estudos indicam que esse produto é capaz de aumentar a imunidade, através do aumento na produção de anticorpos e de outras células do sistema imune, o que certamente pode prevenir ou mesmo combater o desenvolvimento inicial de um câncer (Sforcin, 2007).

Orsolic e col., (2005), realizaram um estudo semelhante com outras variedades de própolis, e verificou a capacidade dessas amostras em prevenir ou bloquear o início do desenvolvimento do processo tumoral através de uma ação sobre a proliferação celular. Ainda sugeriram que a sobrevida dos animais estivesse relacionada ao aumento da imunidade provocado pela ação dos componentes das própolis, os quais, em testes específicos, atuaram diretamente na proliferação e ativação de células macrofágicas.

O tumor sólido de Ehrlich (dorso) foi utilizado para investigar a ação sistêmica de EEPV e EEG6 uma vez que, os princípios ativos devem ser absorvidos e através da circulação atingir o local desejado. Os animais foram tratados a cada 3 dias com os extratos etanólicos EEPV e EEG6 nas doses de 200 e 90mg/kg respectivamente, após 5 dias do inóculo das células tumorais. Após 15 dias os animais foram eutanasiados, o tumor retirado, pesado e medido. Os resultados obtidos mostraram que os animais tratados com EEPV tiveram 100% de inibição do crescimento do tumor e não apresentaram sinais de toxicidade enquanto que os animais tratados com EEG6 tiveram uma inibição de 87%, mas demonstrando o mesmo quadro de toxicidade do ensaio anterior (figura 13).

Ambas os extratos das própolis foram ainda submetidas a um ensaio da atividade antitumoral no modelo de tumor sólido de Ehrlich (pata). Esse ensaio permitiu também avaliar a ação sistêmica de substâncias de uma forma mais exata, uma vez que a avaliação periódica do volume da pata com o uso do pletismômetro permite um melhor acompanhamento do desenvolvimento do tumor e até se necessário o ajuste de doses. Como o EEPV foi o extrato que demonstrou melhor atividade anticâncer até o momento, foi realizada uma curva dose-resposta iniciando com 50mg/kg , 100mg/kg e 200mg/kg . Para EEG6, foi avaliada apenas uma dose, agora de 50mg/kg , devido a sua toxicidade, a fim de verificar a atividade até então acompanhada de elevada toxicidade.

Os resultados mostraram novamente a potente ação antitumoral do EEPV. Como mostrado nas figuras 14 e 15, o EEPV inibiu desde o início o desenvolvimento do tumor sendo diferente significativamente do grupo controle negativo (salina), mas não do grupo controle positivo (doxorrubicina). O EEG6 demonstrou atividade significativa apenas nas duas últimas medições, o que não estimulou a realização de uma curva dose-resposta para o

mesmo. Esses resultados também foram confirmados com o peso relativo do tumor (peso do tumor/peso animal), retirados no fim do experimento após sacrifício dos animais.

O inóculo de células tumorais na pata do animal gera uma ação inflamatória inicial no local seguida do desenvolvimento do tumor através da divisão celular das células tumorais. A ação inicial do EEPV pode estar novamente relacionada a uma ação antiinflamatória que será discutida posteriormente, além é claro de uma ação citotóxica sistêmica. (Matsuno, 1995 e Hayashi, e col., 2000, Nonato, e col. 2009). O papel da PGE2 (mediador inflamatório) no tumor de Ehrlich foi descrito por Parhar & Lala (1988). Estes autores demonstraram que o tumor de Ehrlich na forma sólida induz produção de PGE2 pelos macrófagos do baço, e discutiram que essa prostaglandina poderia atuar na inativação de células NK, linfócitos T e linfócitos B favorecendo o crescimento tumoral.

A atividade antiproliferativa *in vitro* dos EEPV e EEG6 comprovada pela atividade antitumoral *in vivo*, incentivou futuros ensaios com as frações e compostos isolados.

Como dito anteriormente, tanto os extratos quanto frações e compostos isolados foram cedidos através de colaborações externas, como parte do projeto multidisciplinar. O fracionamento do EEPV resultou em duas frações iniciais fração hexânica fr-hex e fr-clo sendo isolados das mesmas, dois compostos: C1 e C2. Frações e compostos isolados foram avaliados nas nove linhagens tumorais já descritas.

Os valores de TGI (tabela 4) apresentados mostram que o processo de fracionamento foi bem direcionado uma vez que, o isolamento dos compostos aumentou o potencial de atividade antiproliferativa para ambas as frações. A fr-hex foi um pouco mais potente que a fr-clo apresentando valores de TGI menores para a grande maioria das linhagens.

Essa diferença na atividade das frações pode estar ligada à composição química das mesmas. Segundo Alencar e col.,(2007), em ambas as frações, foram identificados a

presença de compostos fenólicos principalmente da classe dos flavonóides, sendo em maior quantidade na fr-hex, o que pode estar relacionado a uma ação antiproliferativa mais significativa.

Muitos flavonóides já foram isolados tendo sua ação antiproliferativa e anticâncer comprovadas. As catequinas por exemplo ajudam na prevenção de enfermidades como câncer, pela conversão dos compostos gerados pelos radicais livres em compostos inativos de baixa energia. A epigallocatequina galato previne a promoção do câncer de pele foto induzido. O resveratrol, um flavonóide presente em altas concentrações no vinho tinto, amendoim e casca de uva previne o câncer por inibir o crescimento tumoral, a angiogênese tumoral e a invasão celular (Brownson, 2002).

Os compostos isolados C1 e C2 foram avaliados também quanto à ação antiproliferativa sobre as linhagens tumorais mantendo o mesmo perfil de atividade que as respectivas frações hexânica e clorofórmica. O composto C1 apresentou atividade antiproliferativa e valores inferiores de TGI para todas as linhagens enquanto que C2, também citotóxico, apresentou um valor de TGI elevado para linhagem de mama (MCF-7), indicando ser mais resistente ao composto.

Segundo Oldoni, (2007), ambos os compostos apresentaram atividade antioxidante sendo que C1 foi mais potente. Já nos ensaios de atividade antimicrobiana C2 mostrou uma maior ação (Cabral, 2008).

Através de técnicas específicas de identificação química foi possível verificar que o C1 apresenta características de ***Benzofenonas Preniladas (Xantonas)*** (Oldoni, 2007; Cabral, 2008). As Xantonas são compostos de síntese mista, derivados da via do ácido chiquímico-acetato, apresentando a **benzofenona** como um dos intermediários de sua síntese. São responsáveis por várias atividades farmacológicas dentre elas atividade

antiproliferativa, antitumoral e antiinflamatória (Kupchan e col., 1980; Lawrence e col., 2005; Venu, 2007; Pouli, 2009).

Na literatura encontram-se muitas informações sobre um composto isolado chamado **Garcinol**. Esse composto foi isolado da casca de uma fruta da espécie *Garcinia indica* e trata-se de uma benzofenona poliisoprenilada cuja estrutura química é muito semelhante à estrutura do composto isolado C1. Em estudos *in vitro* o Garcinol demonstrou atividade antiproliferativa sobre linhagens celulares de leucemia humana HL-60, e ainda foi capaz de induzir o processo de apoptose a partir da ativação de caspase-3 seguido de fragmentação do DNA, um mecanismo considerado importante na ação contra células tumorais (Matsumoto, e col., 2003). Sendo assim, devido à semelhança entre as estruturas químicas desses compostos pode-se sugerir que a ação de C1 esteja ligada ao processo apoptótico.

O composto C2 já foi identificado como **Vestitol**, uma isoflavana. As isoflavanas também chamadas de isoflavonóides, em alguns estudos realizados, demonstraram mecanismos gerais de ação dentre eles, efeitos estrogênicos e anti-estrogênicos, regulação do ciclo celular, ação antitumoral (Li e col., 2008; Awale, 2008) efeitos antioxidantes e antimicrobianos (Trusheva e col., 2006;). Em estudos com humanos, animais e sistemas de cultura de célula as isoflavonas genisteína e daidzeína, desempenharam papel importante na prevenção de doenças como osteoporose, do coração, câncer e diabetes (Esteves & Monteiro, 2001; Li, 2008).

Como descrito anteriormente, a única linhagem celular resistente a ação do C2 (vestitol) foi a linhagem de mama, MCF-7. Essa linhagem é estrogênio-dependente e sua resistência ao C2 pode estar relacionada à atividade controversa das isoflavonas.

Alguns autores mostraram que a genisteína, uma isoflavona, seria um preventivo para o desenvolvimento do câncer de mama por apresentar propriedades antiproliferativas (Fritz

e col., 1998), ao passo que outros mostraram que este fitohormônio estimularia o crescimento de tumores estrogênio-dependentes (Hsieh, 1998).

A avaliação específica dessa atividade, sobre os mecanismos estrogênicos e anti-estrogênicos bem como a relação com a atividade antiproliferativa e antitumoral poderá servir de fonte para novos trabalhos que complementem a potente ação farmacológica da própolis vermelha.

A presença desses compostos no EEPV enriquece, complementa e justifica sua ação anticâncer *in vitro* e *in vivo*, o que torna esse produto interessante do ponto de vista farmacológico, merecedor de futuros estudos complementares, que possam contribuir para seu uso terapêutico.

O EEG6 foi fracionado resultando na fração hexânica (fr-hex) de onde um composto (C3) foi isolado. A fração e composto foram testados nas mesmas culturas celulares. De uma forma geral, os valores de TGI do EEG6, fr-hex e C3 (tabela 5) mostram uma manutenção da atividade antiproliferativa com resistência de duas linhagens: NCI-460 e MCF-7.

O composto C3 foi identificado como uma benzofenona prenilada: ***Hiperibona A***, que apresentou também atividade contra células tumorais HeLa e intensa atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus*, e *Actinomyces naeslundii* (Castro e col., 2009).

Ao comparar as atividades antiproliferativa e antitumoral dos EEPV e EEG6, tanto *in vitro*, através dos valores de TGI, quanto *in vivo* demonstrados nos ensaios de tumor de Ehrlich, o destaque foi dado para EEPV, uma vez que EEG6 foi muito tóxico para os animais. Esse estudo, com ambos os extratos, proporcionou a comparação dessas duas variedades com relação a essa atividade farmacológica bem como um alerta para o uso

indevido desses produtos que mais uma vez, dado o não conhecimento da composição química, podem causar danos à população usuária.

O interesse pela pesquisa de novos compostos anticâncer tem recebido grande atenção nos últimos anos visto que, ainda não existem drogas realmente efetivas contra essa doença. Um dos grandes alvos de estudo tem sido o isolamento de compostos de origem natural os quais vêm demonstrando potente atividade antiproliferativa e antitumoral (Cai, 2004; Amin, 2009) como demonstrado aqui. Por esse motivo o melhor conhecimento das propriedades desses produtos, dentre eles a própolis, poderá direcionar a pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas mais eficazes, menos tóxicas e mais seletivas, além da agregação de valor econômico à própolis bruta (Menezes, 2005).

Capítulo 2

1- Introdução: Atividade Antiinflamatória

A inflamação pode ser definida como sendo uma resposta local do tecido agredido, caracterizada por alterações do sistema vascular, dos componentes líquidos e celulares, bem como por adaptações do tecido conjuntivo vizinho. Todas essas alterações dos componentes teciduais são resultantes de modificações que ocorrem nas células agredidas, que passam a adquirir comportamentos diferentes tais como: locomoção, alterações de forma e liberação de enzimas e de substâncias farmacológicas que visam destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo, portanto, uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual (Siqueira & Dantas, 2000; Barbosa-Filho, 2006).

A resposta ao processo inflamatório geralmente é acompanhada de sinais e sintomas clínicos como calor, rubor, edema e dor. O calor e o rubor estão relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo local, o edema com o aumento da permeabilidade vascular e infiltração celular e a dor é induzida pela liberação de diversos mediadores químicos no local da inflamação (Santos, 2003; Silva, 2006; Aller, 2006).

Para tornar-se um agente inflamatório, ou seja, um estímulo que desencadeie fenômenos de transformação nos tecidos, a atividade tem que ser suficientemente intensa para provocar tais reações e ultrapassar as barreiras de defesa externas. Os agentes capazes de desencadear uma resposta inflamatória podem ser de natureza química, física (temperatura e radiação), e biológica (microorganismos), sendo que cada um desses tipos

provoca uma reação inflamatória particular que pode levar a danos nos tecidos envolvidos (Habasy, 2005).

A inflamação é mediada por diferentes mecanismos e pode ser dividida em **reações inatas (pré-inflamatórias)** e **reações imunologicamente específicas**. As **reações inatas** podem ser divididas em eventos vasculares (vasodilatação, hiperemia, aumento da permeabilidade vascular e marginação de neutrófilos) e em eventos celulares. Durante os eventos vasculares são gerados mediadores químicos (bradicinina (BK), histamina e fator de ativação plaquetária (PAF), o sistema complemento, fibrinolítico e de coagulação e prostaglandinas) pelas células, sendo que esses mediadores regulam os eventos vasculares e celulares (Rang, 2004).

Os fenômenos celulares da inflamação envolvem o acionamento das capacidades celulares de movimentação, adesão e englobamento de partículas. Dentre as células envolvidas nesse processo estão células endoteliais vasculares, mastócitos, macrófagos e plaquetas. O principal fenômeno a saída de leucócitos da luz vascular e sua migração para o local agredido (Rang, 2004).

A resposta inflamatória aguda faz parte de uma imunidade inata induzida, de caráter inespecífico, não distinguindo então o agente agressor, tampouco o que é próprio ou não do organismo típica ou relativamente, possui curta duração (horas a dias). As principais características da inflamação aguda são a exsudação de fluido e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos (Siqueira e Dantas, 2000; Laskin e Laskin, 2001; Kumar e col., 2005).

Já a **resposta imunológica adaptativa**, se desenvolve quando os patógenos superam os elementos inatos de defesa. Apresenta alta especificidade e a capacidade de aumentar a atividade de defesa após sucessivas exposições a esse patógeno. A resposta

defensiva do hospedeiro vai se tornando cada vez mais eficaz, como também mais específica ao patógeno invasor: os *linfócitos B*, células-chave para produção de anticorpos, os *linfócitos T* são importantes na indução dessa resposta imunológica e responsáveis pelas reações imunológicas mediadas por células. Essas células migram ao lugar da injúria e iniciam a resposta inflamatória, que quando adequadamente orquestrada, levam a destruição do patógeno e reparo tecidual, mas quando não, a resposta inflamatória torna-se crônica (Laskin, 2001, Rang 2004).

A inflamação crônica esta associada com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, necrose tissular, e fibrose. A inflamação termina quando o estímulo é eliminado e os mediadores secretados são destruídos ou dispersos. Existem também mecanismos antiinflamatórios ativos que modulam a resposta e evitam que ela seja exacerbada (Kumar e col., 2005).

1. 1.- Principais Mediadores Inflamatórios

1. 1. 1 - Histamina

A histamina é uma amina básica armazenada em grânulos no interior de mastócitos e basófilos, sendo liberada por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas mais especificamente, em resposta a uma elevação do teor de Ca^{+} citosólico. A histamina exerce sua ação através de um efeito sobre receptores histamínicos específicos (H_1 , H_2 e H_3) nas células alvo tendo como principais ações nos seres humanos: estimulação da secreção gástrica (H_2); contração da maioria dos músculos lisos (H_1); estimulação cardíaca (H_2); vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e formação de edema (H_1) (Rang, 2004).

O principal papel fisiopatológico da histamina endógena consiste em atuar como mediador de alguns tipos de vômitos, através de uma ação no SNC e como estimulante da secreção gástrica, através de uma ação sobre os receptores H_2 . Além disso, desempenha uma função fisiológica como inibidor de neurotransmissores, particularmente no SNC e trato gastrointestinal. (Rang, 2004, Kumar e col., 2005; Schubert, 2008; Alvarez, 2009).

1.1.2 - Eicosanóides

Os Eicosanóides são produzidos a partir de fosfolipídeos e estão no controle de muitos processos fisiológicos incluindo-se entre os mediadores e moduladores mais importantes da resposta inflamatória (O'Donnell e col., 2009). São derivados do ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, originado da dieta ou da conversão do ácido linoléico (ácido graxo essencial). O AA é liberado dos fosfolipídios de membrana pela enzima fosfolipase A_2 (PLA_2), após estímulos mecânicos, físicos ou químicos. Existem duas formas de PLA_2 , uma encontrada intracelularmente e outra presente nos líquidos extracelulares. É principalmente a forma intracelular que age não apenas no AA, mas também à lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF), que é o precursor de outro mediador da inflamação – o fator de ativação de plaquetas (PAF). Uma vez liberado, o AA é metabolizado por diversas vias – da enzima **ciclooxigenase** (COX) também chamada de PGH sintetase, que dá origem às *prostaglandinas e tromboxanos*; e por várias **lipoxigenases**, que originam os *leucotrienos e lipoxinas* (Alwani e col., 2006; Kumar e col., 2005; Wagner & Roth, 2000; O'Donnell e col., 2009).

As ciclooxigenases apresentam duas isoformas a COX-1 e COX-2. A primeira é uma enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos e desempenha um papel de manutenção no corpo relacionado com a homeostasia tecidual e integridade da mucosa

gastrointestinal. A segunda é induzida nas células inflamatórias quando estas são ativadas além de ser responsável pela produção dos mediadores prostanoídes da inflamação (Burian & Geisslinger, 2005; Pacher *et al.*, 2007; Vanegas & Schaible, 2001). Existem evidências de que a COX-2 esteja envolvida no desenvolvimento de neoplasias, visto que ocorre um aumento na expressão dessa enzima em tumores como câncer de mama e cólon (Rang, 2004; Pereira, 2009).

A atividade da enzima ciclooxygenase, como dito anteriormente, dá origem às prostaglandinas (PG) no endotélio vascular e macrófagos e tromboxanos (TX) nas plaquetas. As prostaglandinas PGI₂ e PGE₂ são potentes vasodiladores que também potencializam o aumento da permeabilidade vascular e inibição da agregação plaquetária, o que resulta na formação de edema que comprime fibras nervosas, potencializando a atividade algica da bradicinina; estimulam a produção de esteróides na adrenal, liberando corticóides que participam do processo inflamatório. Ainda possuem ação citoprotetora gástrica, reduzindo a secreção ácida, aumentando a secreção de muco e bicarbonato e produzindo vasodilatação na mucosa gástrica respectivamente (Norel, 2007). O tromboxano A₂ (TXA₂), tem como principal efeito a agregação plaquetária e vasoconstrição (Smyth, 2008).

A outra via de metabolização do AA se dá pela ação das enzimas **lipoxigenases** responsáveis pela biossíntese dos *leucotrienos e lipoxinas*. Os *leucotrienos* são derivados lipídicos formados pela oxidação do AA no Carbono 5, por intermédio da enzima 5-lipoxigenase, levando a formação do eicosanóide 5-hidroxiperoxieicosatetraenóicos (5-HpETE), que é por fim metabolizado em leucotrienos. O LTA₄ é transformado em LTB₄ através da LTA₄ hidrolase que catalisa a adição de água no LTA₄. O LTB₄ é precursor de uma importante classe de leucotrienos contendo cisteinil: LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (cisteinil-

leucotrienos). Estes cisteinil leucotrienos conhecidos como “substância de reação lenta da anafilaxia” (SRS-A), que gerada no pulmão, está envolvido na asma e outras reações de hipersensibilidade imediata, sendo liberada por mastócitos, basófilos e macrófagos, causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular. A inibição da enzima COX por AINE pode aumentar a quantidade de AA disponível para ser metabolizado pela lipoxigenase, com conseqüente aumento da síntese de LTs (Hevko e Murphy., 2001; Oketani e col., 2001; Peters, 2008).

As *lipoxinas* são produtos da 15-lipoxigenase que atuam sobre receptores específicos em leucócitos polimorfonucleares opondo-se a ação do LTB₄ (Rang, 2004; Boyce, 2008).

1.2 - Principais Agentes Antiinflamatórios

Os principais agentes antiinflamatórios são representados pelos **glicocorticóides** e pelos **agentes antiinflamatórios não- esteroideais (AINEs)**. Os glicocorticóides atuam como imunossuppressores reduzindo a inflamação aguda (redução do influxo e atividade dos leucócitos), crônica (diminuição da atividade das células mononucleares, proliferação diminuída dos vasos sanguíneos e menos fibrose além da diminuição da expansão clonal dos linfócitos T e B. Essas ações poderosas apresentam o risco de suprimir as respostas protetoras necessárias à infecção e reduzir os processos essenciais de cicatrização (Rang, 2004).

Os agentes antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) possuem tanto ação antiinflamatória (redução de edema a partir da redução de prostaglandinas vasodilatadoras) ação analgésica e antipirética. Entretanto, os AINEs são também conhecidos por seus efeitos adversos que incluem danos ao trato gastrointestinal e à circulação renal. A inibição

da COX-1 causada por estes fármacos bloqueia síntese das prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) responsáveis por controlar a secreção ácida gástrica e secreção de muco e bicarbonato (Lima e col., 2006). Além disso, a diminuição na produção de prostaglandinas aumenta a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular devido ao aumento na síntese de leucotrienos, promovendo obstrução do fluxo sanguíneo. No estômago torna a mucosa susceptível ao ataque de radicais livres gerados por neutrófilos ativados (Hawkins e col., 2000; Whelton e col., 2001).

Alguns AINEs causam ainda danos à mucosa gástrica através de um efeito local. Drogas ácidas como a aspirina tornam-se lipossolúveis em baixo pH. Administradas oralmente podem atravessar a barreira lipídica de células da mucosa gástrica. No pH intracelular perdem a lipossolubilidade e ficam retidas, desorganizando a função celular provavelmente por inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial. As células tornam-se então sensíveis ao ataque ácido (Hawkins e col., 2000).

Nos últimos anos, várias pesquisas estão direcionadas para o desenvolvimento de uma nova categoria de medicamentos - os inibidores seletivos da COX-2, que possam diminuir os efeitos colaterais que limitam o uso de AINEs convencionais. Dois novos medicamentos o celecoxib e o rofecoxib inibem preferencialmente a COX-2 demonstrando eficácia analgésica além de causar menores danos à mucosa gástrica. (Rang, 2004).

1.3 - Produtos De Origem Natural e Atividade Antiinflamatória

Produtos naturais, incluindo os derivados de plantas superiores têm dado, nos últimos anos, grande contribuição para o desenvolvimento de terapias farmacológicas modernas. A maioria dos metabólitos secundários derivados de plantas são conhecidos por interferir direta ou indiretamente, com moléculas ou mecanismos como mediadores

inflamatórios, exemplos são os metabólitos do AA e as citocinas; produção e/ou ação de segundos mensageiros, como AMPc, GMPc, proteínas quinases e cálcio; expressão de fatores de transcrição como o NF-kB, e de proto-oncogenes, c-jun e c-fos; e intervenção na expressão de moléculas pró-inflamatórias como a iNO, COX-2, IL-1, TNF, neuropeptídeos e proteases (Calixto e col., 2003).

O primeiro, e um dos maiores exemplos do desenvolvimento de fármacos a partir de remédios vegetais é o ácido salicílico, obtido das cascas de espécies de salgueiro (*Salix* spp). As propriedades analgésicas e antipiréticas destas cascas são conhecidas de antigas civilizações, como o antigo Egito, Grécia, Índia e Roma. O primeiro relato do seu uso é encontrado no papiro de Ebers, uma reunião egípcia de dados medicamentosos, datado de mais de 3500 anos. A oxidação da salicina, um constituinte da casca do salgueiro, origina o ácido salicílico, que teve seu uso limitado por causar intensa irritação gástrica. Mais tarde, a acetilação da molécula deu origem ao ácido acetilsalicílico, um dos fármacos de maior sucesso da história (Roberts & Morrow, 2003; Setty & Sigal, 2005).

Alguns produtos naturais vêm sendo estudados com o objetivo de descobrir compostos com ação antiinflamatória com menores efeitos colaterais. Além de plantas, outros produtos de origem natural, como diferentes variedades de própolis, vêm sendo avaliadas tendo sua ação antiinflamatória comprovada.

Em trabalhos realizados com camundongos e coelhos constatou-se uma atividade antiinflamatória de soluções hidroalcoólicas da própolis, tanto em aplicações tópicas, bem como através de injeções ou mesmo via oral (Park e col., 1996; (Ledon e col. 1997; Menezes e col. 1999; Ozturk e col. 2000). Esta propriedade deve-se à presença na própolis de compostos tais como o ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE). A atividade antiinflamatória seria resultante da supressão da síntese

de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos. A participação do CAPE isolado da própolis, na inibição da síntese de prostaglandinas foi também constatada por Borrelli e col. (2002).

A atividade antiinflamatória das variedades estudadas nesse trabalho: Própolis do Grupo 6 (EEG6) e Vermelha (EEPV) foram avaliadas em dois modelos de inflamação: edema de orelha induzido por óleo de cróton (tópico) e edema de pata induzido por carragenina.

2 - Material e Métodos

2.1 - Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton (Ação Tópica)

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss machos, pesando entre 25-35g, separados em 4 grupos (n=8), sendo 2 grupos de tratamento. Em cada um desses grupos foi aplicado topicamente, na orelha esquerda, 20µl dos extratos própolis nas doses: EEPV (200mg/ml) e EEG6 (90mg/ml) diluídos em acetona. Para os outros dois grupos foi aplicado também na orelha esquerda, em um deles, acetona e em outro dexametasona (4mg/ml), utilizada como controle positivo. Após 60 minutos dos tratamentos, foram aplicados 20µl de uma solução de óleo de cróton a 5 % em acetona P.A. na superfície interna da orelha esquerda. Na orelha direita foi aplicado volume equivalente do solvente. Após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e porções padronizadas (6mm diâmetro) das duas orelhas foram retiradas. Cada uma delas foi pesada separadamente e a diferença de peso foi considerada como o edema produzido pelo óleo de cróton (Tubaro e col., 1985 e Shiantarelli, 1982).

2.2 - Edema de pata induzido por carragenina (Ação Sistêmica)

Para a realização deste experimento foram utilizados 8 grupos (n=5) (*Rattus norvegicus*) Wistar machos (100-150g, em jejum de 12h) por grupo/tratamento. Inicialmente, foi medido o volume das patas esquerdas traseiras de cada animal, em um hidropletismômetro, sendo registrado como leitura basal. As patas foram submergidas, até o maléolo lateral, em um recipiente contendo uma solução de NaCl 0,9%. Este dispositivo foi conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro, menor, contendo um

transdutor de volume ligado a um multímetro digital. Após leitura basal, os grupos foram tratados via ip, solução de NaCl 0,9% (10ml/kg), EEPV (200, 100 e 50mg/kg); e EEG6 (90, 60 e 30mg/kg) e indometacina (10mg/kg), utilizada como controle positivo. Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1ml de carragenina 1% em solução fisiológica na pata traseira esquerda.

Após a injeção do agente edematogênico e em intervalos pré-estabelecidos (a cada 1 hora), o volume da pata foi aferido novamente. As variações de volume, mediante a imersão das patas no recipiente maior, foram numericamente registrados no multímetro digital a cada 1 hora, totalizando 5 medições, após as injeções de carragenina (agente flogístico) (Winter e col., 1962).

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (ml), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, para cada grupo de tratamento ou expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle.

3. - Resultados

3.1 - Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

Os EEPV e EEG6 foram capazes de reduzir o edema de orelha induzido por óleo de cróton sendo esta atividade significativa para a EEPV. A dexametasona, usada como controle positivo na dose de 4 mg/ml e administrada pela mesma via, reduziu o edema em 79%. O EEPV (200mg/ml) reduziu o edema em 54,5% e o EEG6 (90mg/ml) em 10,5%, após 4 horas da administração do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados na figura 16.

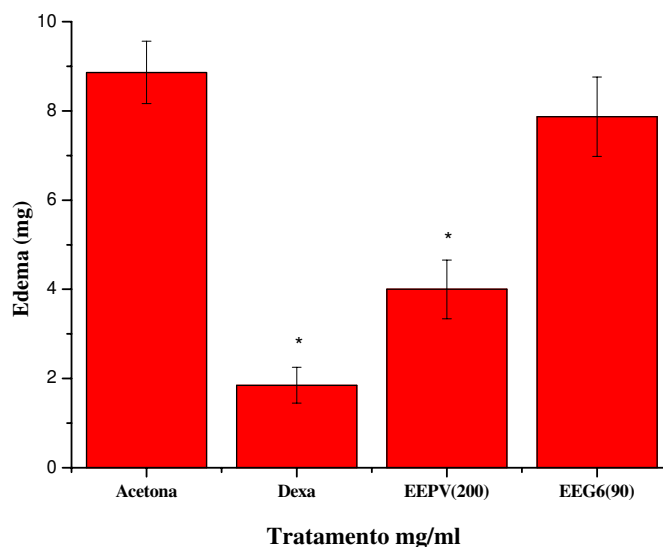


Figura 16: Efeito da administração tópica de dexametasona e dos EEPV e EEG6 no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. * $p < 0,001$, em relação ao grupo salina (NaCl 0,9%). (ANOVA).

3.2 - Edema de Pata Induzido por Carragenina

Nos animais controles tratados com salina (10 ml/kg , p.o.), a injeção subplantar de carragenina induziu a formação de um edema progressivo que atingiu o pico máximo após 4 horas da aplicação do agente flogístico. O tratamento prévio com o EEPV (200mg/kg , p.o.) reduziu o edema em 48, 55, 50 e 55% após 2, 3, 4 e 5 hs da injeção subplantar de carragenina. A administração prévia das doses menores do EEPV (100 e 50mg/kg) bem como do todas as doses do EBG6 não alteraram o edema de pata induzido pela carragenina. A indometacina (10mg/kg , v.o.), controle positivo do teste, apresentou um pico de inibição significativa do edema apenas a partir da quarta hora da injeção do agente flogístico (48 e 60%). Os resultados estão demonstrados na figura 17.

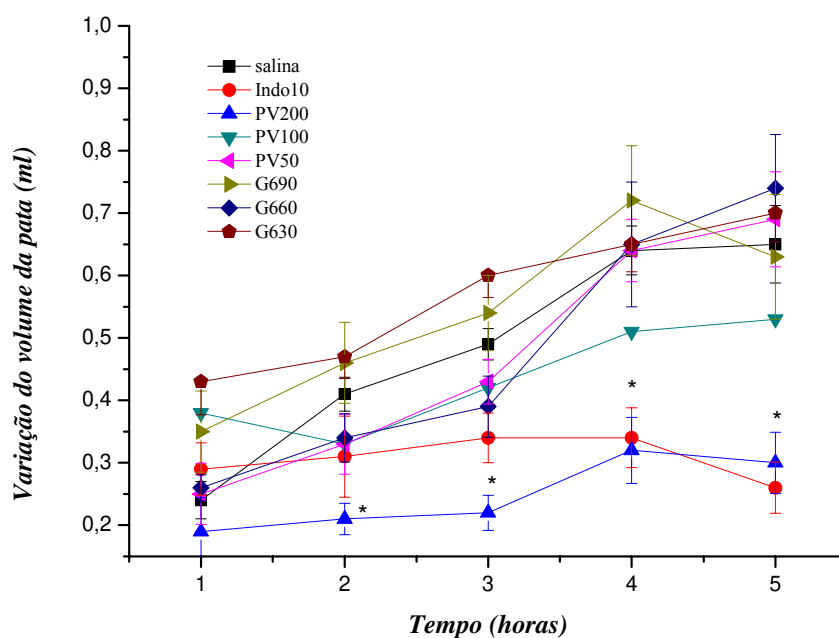


Figura 17: Efeito da administração sistêmica de indometacina, EEPV (50, 100, 200mg/kg) e EEG6 (30, 60, 90 mg/kg) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,001$, em relação ao grupo salina (NaCl 0,9%) (ANOVA).

4 - Discussão

Algumas própolis estudadas por diversos autores vêm demonstrando uma potente ação antiinflamatória. Segundo Volpert & Elstner (1996) os extratos de própolis podem atuar como antiinflamatórios especialmente por serem carreadores de radicais livres, tal como o superóxido produzido pela NADPH oxidase dos neutrófilos ativados, evitando ruptura abrupta e inundação do tecido afetado com espécies reativas (Korkina, 2007).

Outros estudos revelaram ação específica de compostos isolados desses produtos, como o Artepilina C, na diminuição da síntese de histamina, prostaglandina e óxido nítrico, substâncias estas relacionadas ao processo inflamatório (Paulino e col., 2008; Nagaoka e col., 2003). A atividade antiinflamatória também foi comprovada por outro composto bastante citado na literatura, o éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE), que foi capaz de inibir a expressão do fator de necrose tumoral (TNF), a produção de interleucinas além de inibir a expressão do fator nuclear NF-kappaB (Song, 2008). O TNF- α é um potente ativador de neutrófilos e fagócitos mononucleares; serve como fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (Sherwood & Toliverkinsky, 2004); aumenta a permeabilidade vascular; promove a liberação do fator nuclear-kB (NF-kB) no citosol, ao estimular a degradação da subunidade inibitória I κ B. O NF-kB regula a síntese de muitas proteínas que funcionam em vias inflamatórias, incluindo IL, INF- β , TNF- α e ciclooxigenases (COX) (Alwani e col., 2006; Burian & Geisslinger, 2005; Kumar et al., 2005; Witkamp & Monshouwer, 2000).

A formação de edema está entre os sinais iniciais da inflamação. O edema é causado pelo fluxo transvascular de fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para

dentro do interstício, como resultado da ação da liberação de mediadores químicos como histamina, bradicinina, óxido nítrico, citocinas, prostaglandinas dentre outros. Estes fatores alteram de forma marcante as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade de capilares e vênulas a água e proteínas (Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

Para avaliar a atividade antiedematogênica dos extratos brutos das própolis EEPV e EEG6, foi utilizado o modelo de ***Edema De Orelha Induzido Por Óleo De Cróton***. O óleo de cróton induz uma dermatite sensível à ação de antiinflamatórios de uso tópico, mas responde também à administração sistêmica de antiinflamatórios esteroidais. (Tubaro, 1985; Segura, 1998).

Outro ensaio utilizado para a avaliação da atividade antiedematogênica foi o ***Edema De Pata Induzido Por Carragenina***. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado, derivado de algas marinhas usada como estímulo inflamatório, para induzir artrites em modelos animais com roedores (Winter e col., 1962).

Inicialmente, a atividade antiedematogênica dos extratos EEPV e EEG6 foi avaliada no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton via tópica. Os resultados revelaram uma ação positiva para EEPV, ocorrendo uma redução do edema em 54,5%. O EEG6 não reduziu significativamente o edema (figura 16).

Esta ação local pode ser proveniente do seqüestro de radicais livres pelos compostos presentes em EEPV, gerados por neutrófilos (primeiras células a serem ativadas pela invasão de patógenos, sendo os primeiros a penetrarem na área inflamatória), acionados pela ação inflamatória do óleo de cróton e que resultaria em uma atividade antiinflamatória final (Moreno e col., 2000). Como demonstrado anteriormente, essa própolis possui

excelente atividade antioxidante (Alencar e col., 2007; Oldoni 2007), que poderia ser responsável pela atividade em questão.

Esse extrato pode ter apresentado também uma resposta antiinflamatória, semelhante ao mecanismo de ação da dexametasona, utilizada como controle positivo. A dexametasona é um glicocorticóide, que após aplicação tópica apresenta efeito antiflogístico, antialérgico, antipruriginoso, antiproliferativo e antiedematoso. A administração tópica deste fármaco pode evitar ou suprimir a inflamação em resposta a múltiplos eventos mecânicos, químicos, infecciosos e imunológicos. Os glicocorticóides atuam na redução da liberação de fatores vasoativos (formação do edema) e quimiotáticos (migração de células do processo inflamatório) e redução do extravasamento de leucócitos nas áreas de lesão (Chrousos, 1995).

Para comprovação de uma ação antiinflamatória sistêmica, foi realizado então um novo ensaio utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Para esse modelo os mesmos extratos foram avaliados agora em 3 doses: 50, 100 e 200 mg/kg para EEPV e 30, 60 e 90 mg/kg para EEG6. O tratamento prévio com o EEPV (200mg/kg) reduziu o edema em 48, 55, 50 e 55% após 2, 3, 4 e 5 hs da injeção subplantar de carragenina, respectivamente, enquanto que o controle positivo indometacina (10 mg/kg), apresentou um pico de inibição significativa do edema apenas a partir da quarta hora da injeção do agente flogístico (48 e 60%).

O EEG6 não foi ativo neste modelo corroborando com o ensaio anterior (figura 17).

A injeção subplantar de carragenina na pata traseira dos animais causa um edema constituído por uma fase inicial rápida e por uma fase tardia mais sustentada. A primeira fase é mediada pela liberação de histamina, serotonina e cininas, enquanto que a segunda

fase é relacionada à liberação de prostaglandinas (Winter, e col. 1962; Kale e col. 2007; Morris, 2003; Ince e col., 2009).

A ação antiinflamatória do EEPV observada nos dois modelos descritos acima, e principalmente a comprovação de sua ação sistêmica, pode estar relacionada à inibição do processo inflamatório em ambas as fases, mas o real mecanismo de ação desse extrato ou mesmo dos seus princípios ativos só poderá ser confirmado através de ensaios mais específicos.

Dados da literatura mostram que compostos como benzenonas e isoflavonóides, de estruturas semelhantes aos compostos C1 e C2, isolados do EEPV, possuem atividade antiinflamatória relacionada à inibição da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) (Kim e col., 2003; Venu, e col., 2007; Hu, 2008; Masullo, 2008; Koeberle, e col., 2009).

Um dado muito importante e já anteriormente citado no Capítulo 1, diz respeito ao **Garcinol**, de estrutura química semelhante ao C1 (benzofenona prenilada) isolado do EEPV. Além da atividade antiproliferativa, indução de apoptose e fragmentação do DNA, processos importantes na inibição do desenvolvimento tumoral, esse composto demonstrou uma atividade de inibição na expressão da enzima COX-2 (Hong e col., 2006). A COX-2 é uma das isoformas da enzima ciclooxigenase, que é induzida nas células inflamatórias quando estas são ativadas, além de ser responsável pela produção dos mediadores prostanóides da inflamação (Vanegas & Schaible, 2001; Burian & Geisslinger, 2005; Pacher e col., 2007).

A COX-2, segundo alguns autores, ainda está relacionada com desenvolvimento de neoplasias, visto que ocorre um aumento na expressão dessa enzima em tumores como câncer de mama e cólon (Rang, 2004; Pereira, 2009; Zumsteg e col., 2009).

Awara e col., (2004) avaliaram a ação anticâncer do ***Celecoxib***, um antiinflamatório (AINE) inibidor específico da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) no modelo de tumor sólido de Ehrlich na pata, o mesmo utilizado no presente trabalho. O tratamento dos animais com essa droga inibiu o crescimento do tumor, além de promover a fragmentação do DNA das células tumorais. O ***Celecoxib*** foi também administrado em outro grupo/tratamento juntamente com a doxorrubicina (quimioterápico) potencializando sua ação.

Novos estudos direcionados a esse ponto devem ser realizados para comprovação direta da relação entre atividade anticâncer e antiinflamatória do EEPV tendo em comum a inibição da expressão enzima cicloxigenase-2 (COX-2).

Capítulo 3

1 - Introdução: Atividade Antiulcerogénica

1.1 - Úlcera Péptica

As úlceras pépticas, classificadas em úlcera gástrica e úlcera duodenal, dependendo da sua localização, são doenças que afetam um número considerável de pessoas no mundo inteiro e alguns autores as consideram como novas "pestes" do século XXI (O'Malley, 2003; Snowden, 2008).

Por definição, as úlceras pépticas são lesões profundas que ocorrem no epitélio gastrointestinal. É uma patologia complexa e multifatorial, cuja etiologia está relacionada ao desequilíbrio entre fatores agressores endógenos (ácido clorídrico e pepsina) e exógenos (estresse, alimentos, condimentos, fumo, álcool e antiinflamatórios não-esteroidais (AINE) e os defensores da mucosa gástrica (muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico e fluxo sanguíneo), ocasionando irritação, ulceração da mucosa e sangramento (Wallace, 2001; Dembinski e col., 2004; Schubert, 2008). Geralmente, os estímulos lesivos sobre a mucosa, responsáveis pela formação de úlceras pépticas, são acompanhados por danos microvasculares locais, com conseqüente isquemia, diminuição da distribuição de nutrientes, formação de radicais livres e necrose tecidual (Tarnawshi, 2005).

1.2 - Mecanismos de Defesa da Mucosa Gástrica

Os mecanismos de defesa da mucosa gástrica podem ser subdivididos em proteção *pré-epitelial*, *epitelial* e *subepitelial* sendo que funcionam em conjunto para prevenir as lesões (Flemström & Isenberg, 2001; Ham, 2008).

A *proteção pré-epitelial* é constituída pela barreira muco-bicarbonato. Acredita-se que esta barreira forma a primeira linha de defesa da mucosa do estômago e duodeno contra agentes nocivos como o HCl, a pepsina luminal e outros agentes lesivos (Mojzis e col., 2000; Wallace, 2001; Zhu, 2008; Shubert, 2008).

O muco gastroprotetor forma um fino revestimento sobre as células superficiais da mucosa que protege as células subjacentes das forças mecânicas da digestão. É constituído por uma camada de glicoproteínas em forma de gel denominada mucina, insolúvel em água. Esta camada de muco aderida à mucosa gástrica protege o epitélio contra o ácido clorídrico, pepsina e outros agentes necrozantes como etanol, e antiinflamatórios não-esteroidais, além de participar na recuperação da injúria gástrica (Allen, 1993; Kutchai, 2000; Zhu, 2008).

O bicarbonato é secretado juntamente pelas mesmas células superficiais do estômago e duodeno em resposta a vários estímulos como prostaglandinas, peptídeos gastrointestinais e contato com o ácido gástrico, permanecendo abaixo ou em contato com a camada mucosa. Em condições normais, o bicarbonato neutraliza os íons H^+ , enquanto se difunde através da camada de muco estabelecendo um gradiente de pH entre a luz e as células epiteliais superficiais (Kutchai, 2000; Zhu, 2008).

A *proteção epitelial* é dada pelas propriedades intrínsecas das células epiteliais que apresentam morfologia e constituição bioquímica necessárias para limitar a difusão e

permeabilidade intracelulares. Esta proteção pode ser ativada por alguns mecanismos que preservam as células existentes ou regeneram o tecido lesionado (Szabo, 1991).

❖ **Hidrofobicidade da mucosa gástrica e junções intercelulares:** As junções fechadas e outras barreiras intercelulares controlam a passagem de agentes lesivos do lúmen para a mucosa gástrica, para espaços intersticiais e submucosos. Agentes que conseguem atravessar estas junções ainda são restritos pela membrana celular das células gástricas, que são compostas por elevada concentração de fosfolipídios, restringindo a difusão de moléculas hidrofílicas, como o íon H^+ (Szabo, 1991; Flemström & Isenberg, 2001).

❖ **Divisão e migração celular:** Quando as barreiras gástricas são destruídas e ocorre a morte celular, as células necróticas podem ser repostas pela migração das células epiteliais sobreviventes nas bordas da lesão ou pela divisão das células do colo glandular que migram até o lúmen e diferenciam-se em células epiteliais superficiais (Szabo, 1991). O fator de crescimento epidermal acelera a cicatrização das úlceras tanto por estimular a proliferação e a migração celular, modular o fluxo sanguíneo, assim como por inibir a secreção de ácido e pepsinas (Orsini, 1993; Konturek e col., 1984).

❖ **Sistema Antioxidante:** As espécies reativas do oxigênio (ERO) são geradas constantemente nas células durante alguns processos, como na cadeia transportadora de elétrons (na fosforilação mitocondrial), durante o metabolismo de xenobióticos e durante a resposta inflamatória. As ERO, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($HO^\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são moléculas altamente reativas que interagem indiscriminadamente com macromoléculas essenciais, como o DNA, as proteínas e lipídeos. Assim, defesas celulares antioxidantes são necessárias para manter a homeostase celular (Cnubben e col., 2001).

A Proteção *Sub-epitelial* envolve alguns fatores que garantem os processos de defesa da proteção pré-epitelial:

❖ **Microcirculação gástrica:** O fluxo sanguíneo protege a mucosa por assegurar a chegada de uma quantidade ótima de oxigênio, nutrientes e bicarbonato. Quando o ácido gástrico ou outro agente irritante invade o compartimento subepitelial, neurônios sensoriais aferentes são capazes de disparar um rápido aumento no fluxo sanguíneo da mucosa que permite o tamponamento do ácido e uma rápida remoção de substâncias tóxicas, limitando, desta forma, sua penetração em camadas mais profundas da mucosa (Wallace & Granger, 1996).

❖ **Tônus muscular:** A modulação farmacológica do esvaziamento gástrico, da motilidade duodenal e da mistura ácido-base representa mecanismos de defesa gástrica. Os vasos sanguíneos gástricos atravessam a muscularis mucosae tanto perpendicularmente quanto obliquamente. Assim, a contração do músculo liso da parede gástrica comprime os pequenos vasos, favorecendo a lesão endotelial e o desenvolvimento de congestão e estase local por drogas como o etanol (Szabo, 1991).

❖ **Resposta inflamatória aguda:** Quando os níveis superficiais da defesa da mucosa falham ou são inundados por uma lesão luminal, o próximo nível de defesa da mucosa é a resposta inflamatória aguda. Os neutrófilos migram da circulação para o local da lesão para facilitar o reparo e reduzir a entrada de microorganismos na circulação sistêmica (Wallace, 2001).

1.3 - Regulação da Secreção Gástrica

O ácido gástrico produzido no estômago facilita a digestão de proteínas, a absorção de ferro, cálcio, vitamina B12, e previne o crescimento bacteriano e a infecção entérica.

Entretanto, quando os níveis de ácido e pepsina se sobrepõem aos mecanismos de defesa da mucosa, há a formação de úlceras. Para prevenir estas lesões, a secreção ácida gástrica pode ser precisamente regulada por mecanismos centrais e periféricos (Wallace, 2001, Schubert, 2004; Wallace, 2008).

A **regulação central** consiste na estimulação vagal pelo sistema nervoso central e consequente liberação pós-ganglionar de neurotransmissores no epitélio gástrico. A inervação do estômago compreende fibras extrínsecas e intrínsecas, sendo que a extrínseca é constituída por ramos autonômicos, através de fibras parassimpáticas de origem vagal e terminam no plexo mientérico da parede do estômago. A grande maioria das fibras nervosas gástricas estende-se pelo estômago pela via do nervo vago. A inervação intrínseca compreende neurônios intrínsecos que formam o submucosa, plexo mientérico e gânglio seroso (Ekblom, e col., 2000).

Os **mecanismos periféricos** da secreção gástrica envolvem os seguintes principais mediadores:

❖ **Gastrina:** A gastrina é produzida pela célula G antral, sendo o principal hormônio estimulante da secreção ácida durante a ingestão de alimento. Esse hormônio é secretado na circulação sanguínea principalmente na fase cefálica da secreção, estimulada pela acetilcolina liberada pelo nervo vago, pela presença de peptídeos, aminoácidos e cálcio no suco gástrico; pela distensão gástrica, por catecolaminas e bombesina. As células G da mucosa antral secretam a gastrina, que atua em receptores do tipo CCK2 e que juntamente com a acetilcolina, promove a liberação de histamina pelas células enterocromafins (ECL). Além disso, a gastrina pode interagir com os receptores CCK2 na célula parietal e estimular diretamente a produção de ácido. (Schubert, 2004)

❖ **Histamina:** No estômago, a histamina é estocada em maior quantidade nas células ECL localizadas na terceira porção inferior da glândula oxíntica (Prinz e col., 2003). É armazenada em vesículas secretoras, sendo liberada após estimulação por gastrina, pelo fator de transformação do crescimento-alfa (TGF- α), pelo peptídeo intestinal vasoativo, e pelo peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP) (Zhao e col., 2003; Zhao e col., 2004). A histamina liberada se difunde para as células parietais vizinhas e estimula a secreção de ácido pela ligação com os receptores H-2 expressos na superfície da célula parietal (Prinz e col., 2003; Schubert, 2004).

❖ **Acetilcolina:** A acetilcolina (ACh), liberada dos neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso entérico, estimula diretamente a secreção de ácido através da ativação dos receptores M-3 nas células parietais. Hirschowitz (1983) demonstrou que receptores do tipo M1 presentes nas células do tipo enterocromafins (ECL), quando bloqueados por antagonista específico M1, inibem a liberação de histamina, reduzindo a secreção ácida gástrica.

❖ **Prostaglandinas:** As prostaglandinas (PGs) inibem a secreção de ácido por ação direta na célula parietal ou indiretamente pela inibição da liberação de gastrina. Nas células parietais, as PGs modulam a secreção ácida por inibir o aumento de AMPc induzido por histamina (Atay e col., 2000; Schubert, 2008).

Atualmente, sabe-se que o uso crônico de medicamentos que inibem a produção de prostaglandinas, como os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), causa danos à mucosa gástrica, constituindo um fator de risco para eventos adversos como ulceração, sangramento e perfuração gástrica (Whittle, 2004; Newton, 2005; Wallace, 2008).

A utilização de medicamentos como anticoagulantes, antiinflamatórios esteroidais, também contribuem com a formação de úlceras (Jones & Hawkey, 2001). Novos

antiinflamatórios vêm sendo desenvolvidos a fim de amenizar tais efeitos. São os antiinflamatórios inibidores da Ciclooxigenase -2 (COX-2), são mais seletivos, mantêm a mesma atividade, preservando a mucosa gástrica (Lakatos, 2008). Não só o uso de medicamentos, mas também, a idade é um dos principais fatores para o aumento da prevalência e patogênese da úlcera péptica, principalmente no estômago, devido à perda gradual de mecanismos de proteção e reparo da mucosa, envolvendo diminuição do conteúdo de prostaglandinas (Jones & Hawkey, 2001; Newton, 2005)

❖ **Óxido Nítrico:** O óxido nítrico é sintetizado por uma reação enzimática entre oxigênio molecular e a L-argenina. Desempenha papel fundamental nos sistemas cardiovascular e nervoso central bem como no sistema de defesa do organismo (Tatemichi e col., 2003; Bryan e col., 2009). No trato digestivo atua sobre a secreção de muco, fluxo sanguíneo, secreção de bicarbonato, bem como sobre a resistência da mucosa a agressores (Bighetti e col., 2002). O seu efeito citoprotetor se dá por promover vasodilatação e consequentemente um aumento do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica, acelerando a retirada dos íons H^+ e aumentando o aporte de nutrientes para a mesma (Laine e col., 2008; Qui e col., 2003).

1.4 - Produtos de Origem Natural e Atividade Antiulcerogênica

Nos últimos anos, as lesões gastrointestinais vêm tornando-se um dos principais focos de investigações experimentais e clínicas, adquirindo ênfase comercial para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Whittle, 2004). A maioria das drogas usadas no tratamento de enfermidades gastrointestinais neutraliza a secreção ácida como os antiácidos, bloqueadores dos receptores H_2 de histamina, como a ranitidina, cimetidina, famotidina, anticolinérgicos como o pirenzepina, telezepina, bloqueadores de bomba de

prótons como o omeprazol, lanzoprazol, etc. com interferência do ácido acético (Rao e col., 2004).

Os produtos naturais, principalmente oriundos de plantas foram e continuam sendo de grande relevância na área farmacêutica, tendo em vista a utilização das substâncias ativas isoladas como protótipos para a obtenção de fármacos, ou de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos. No segmento industrial, é nítido o ressurgimento do interesse em produtos naturais como fonte de modelos para fármacos e como matéria-prima para desenvolvimento de fitoterápicos (Schenkel e col. 2001).

Com relação aos fármacos de origem natural com ação citoprotetora destaca-se a carbenoxolona sódica, obtida das raízes do alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), a qual já é comercializada possuindo como mecanismo de ação um aumento dos níveis de prostaglandina na mucosa gástrica o que conseqüentemente promove um aumento na produção de muco e bicarbonato garantindo uma melhor proteção contra o ácido clorídrico e a pepsina (Lewis & Hanson, 1991; Asl, 2008).

A atividade citoprotetora desses produtos geralmente é dada pela ação de flavonóides, metabólitos secundários de plantas, amplamente encontrado em uma dieta rica em vegetais. O consumo desses alimentos promove uma gastroproteção local, inibindo a secreção gástrica, além de atuarem como agentes antioxidantes (Mota e col., 2009).

Vários estudos têm demonstrado que diferentes variedades de própolis possuem participação na citoproteção gástrica. Cardinale e col., (2003) mostrou em estudos realizados com própolis, propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras, feridas e hepatoproteção, atividades estas possivelmente relacionadas com a ação antioxidante da própolis, uma vez que quando os radicais livres são produzidos, dificultam

ou mesmo impedem que ocorra a regeneração das células no local. A remoção dos mesmos pelos flavonóides da própolis permitiria que o órgão ou tecido doente pudesse se regenerar normalmente.

Barros (2008) realizou diferentes ensaios com uma própolis verde brasileira, comprovando sua ação sobre a proteção gástrica. Esse produto demonstrou, em modelos de úlcera induzida por etanol, AINE e stress, diminuição significativa no número de lesões, bem como redução do volume de secreção gástrica, aumento do pH e redução da acidez estomacal, em modelos de ligadura do piloro.

Esses mesmos modelos foram utilizados para avaliar a atividade antiulcerogênica das duas novas variedades de própolis: G6 e Vermelha.

2 - Material e Métodos

2.1 - Atividade Antiulcergênica induzida por Etanol

Após um período de 24 horas em jejum, com acesso livre à água, ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, foram separados em 8 grupos (n=5) onde cada grupo recebeu, por via oral, o tratamento correspondente, ou seja, NaCl 0,9% (10 ml/kg) como controle negativo, carbenoxolona (200 mg/kg), como controle positivo e os EEPV e EEG6, nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg e 50, 100 e 150 mg/kg respectivamente. Após 30 minutos da última administração, foi realizada a administração oral de 1ml de etanol absoluto, de acordo com a metodologia descrita por Robert, (1979). Os animais foram sacrificados uma hora depois, por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em NaCl 0,9% para posterior contagem e avaliação das lesões ulcerativas. O índice de lesões ulcerativas (ILU) foi calculado por meio da somatória dos parâmetros, de acordo com a pontuação sugerida por Gamberini e col., 1991 (Tabela 7).

Tabela 7: Parâmetros observados para cálculo do ILU.

PARÂMETROS	PONTUAÇÃO	
Perda de pregas da mucosa	1 ponto	
Descoloração da mucosa	1 ponto	
Edema	1 ponto	
Hemorragias	1 ponto	
Petéquias	até 10 petéquias	2 pontos
	+ de 10 petéquias	3 pontos
Úlceras até 1 milímetro	*n x 2 pontos	
Úlceras maiores que um milímetro	*n x 3 pontos	
Úlceras perfuradas	*n x 4 pontos	

*n refere-se ao número de lesões observadas.

Para a determinação da porcentagem de inibição do índice de lesões ulcerativas apresentados pelos grupos tratados em relação ao grupo controle, foi utilizada a seguinte fórmula: $(\text{Média}_{\text{controle}} - \text{Média}_{\text{tratado}}) / \text{Média}_{\text{controle}} (\times 100)$

2.2 - Atividade Antiulcerogênica: Triagem do Mecanismo de Citoproteção

Para avaliação do mecanismo de ação foram calculadas as doses efetivas de ambos os extratos das própolis, a partir do modelo de úlcera induzida por etanol: 50 mg/kg (EEG6) e 70 mg/kg (EEPV).

Primeiramente foram avaliados os *mecanismos de citoproteção gástrica* que envolve a participação de substâncias sulfidrílica, de prostaglandinas e óxido nítrico.

1 - Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas não Proteicas na Citoproteção Gástrica

Foram utilizados ratos Wistar machos, em jejum por um período de 24 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em 6 grupos (n=5). Três grupos foram tratados previamente, via subcutânea, com N-etilmaleimida (alquilante de função sulfidrílica) na dose de 10 mg/kg e três grupos não foram tratados.

Após 30 minutos cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento: dois grupos (tratados e não tratados com N-etilmaleimida) receberam solução de NaCl 0,9% na dose de 10 ml/kg como controle negativo; outros dois grupos (tratados e não tratados com N-etilmaleimida) receberam o EEG6 na dose de 50 mg/Kg e os últimos dois grupos (tratados e não tratados com N-etilmaleimida) receberam o EEPV na dose de 70 mg/Kg. Após 30 minutos, foi repetido o procedimento do item **2.1**.

2 - Estudo da Participação de Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica

Foram utilizados ratos Wistar machos, em jejum por um período de 24 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em seis grupos de 5 animais. Três grupos foram tratados previamente por via intraperitoneal com indometacina na dose de 5 mg/Kg e três grupos não foram tratados.

Após 30 minutos cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento: dois grupos (tratados e não tratados com indometacina) receberam solução de NaCl 0,9% na dose de 10 ml/kg como controle negativo; outros dois grupos (tratados e não tratados com indometacina) receberam o EEG6 na dose de 50 mg/Kg e os últimos dois grupos (tratados e não tratados com indometacina) receberam o EEPV na dose de 70mg/Kg . Após 30 minutos, foi repetido o procedimento do item **2.1**.

3 - Estudo da Participação do Óxido Nítrico na Citoproteção Gástrica

Foram utilizados ratos Wistar machos, em jejum por um período de 24 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em seis grupos de 5 animais. Três grupos foram tratados previamente com uma solução aquosa de L-Name (inibidor da NO sintase), via endovenosa na dose de 5 mg/Kg .

Após 30 minutos cada grupo de animais recebeu por via oral, o respectivo tratamento: dois grupos (tratados e não tratados com L-Name) receberam solução de NaCl 0,9% na dose de 10 ml/kg como controle negativo; outros dois grupos (tratados e não tratados com L-Name) receberam o EEG6 na dose de 50 mg/Kg e os últimos dois grupos (tratados e não tratados com L-Name) receberam EEPV na dose de 70 mg/Kg . Após 30 minutos, foi repetido o procedimento do item **2.1**.

2.3 - Atividade Antisecretória do EEPV e EEG6

Foi realizado um ensaio inicial de **Ligadura de Píloro** para verificar a ação antisecretória dos extratos das própolis avaliadas. Esse ensaio foi realizado segundo método desenvolvido por Shay e col. (1945).

Foram utilizados ratos Wistar machos em jejum por um período de 24 horas com livre acesso à água. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5), anestesiados pela administração de pentobarbital sódico 3% para realização de tricotomia, incisão abdominal e a ligadura do píloro com linha cirúrgica de algodão.

Logo após a ligadura, cada grupo de animais recebeu por via intraduodenal, o tratamento correspondente: o primeiro grupo recebeu solução de NaCl 0,9% na dose de 2,5 ml/kg como controle negativo, o segundo grupo recebeu solução aquosa de cimetidina, na dose de 100 mg/kg, como controle positivo e os dois últimos grupos receberam o EEG6 e EEPV nas doses de 50 e 70 mg/kg respectivamente diluídos em solução de NaCl 0,9%. O abdômen foi então suturado e, após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o abdômen foi aberto e o estômago retirado para determinação do volume do conteúdo estomacal, pH e a concentração de íons H^+ (mEq/L/4h), através de titulação com solução de NaOH 0,05N, utilizando-se solução de fenolftaleína (1%) como indicador. A concentração de Ácido Total em mEq/L/4h foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$[total\ de\ ácido] = fator\ 1,825 \times Vol.de\ NaOH(ml) / Vol.\ gástrico\ (ml)$$

2.4 - Atividade anti-secretória dos extratos etanólicos (EEPV) e (EEG6) em ratos estimulados com os secretagogos betanecol (B), pentagastrina (P) e histamina (H)

Os experimentos foram realizados em três dias diferentes sendo que em cada dia foi utilizado um estímulo diferente (B ou H ou P), mas a metodologia é a mesma e por isso será descrita de uma forma geral.

Após a ligadura, segundo item 2.3, cada grupo recebeu os seguintes tratamentos NaCl 0,9% (controle negativo), NaCl 0,9% + B /H/ P, EEPV (70 mg/kg), EEPV + B /H/ P, EEG6 (50 mg/kg), EEG6 + B /H/ P, dependendo do experimento. Os secretagogos betanecol (B), pentagastrina (P) e histamina (H) foram administrados em diferentes experimentos, 1 hora após a cirurgia. O Betanecol foi administrado via intraperitoneal na dose de 2,5 mg/kg , a Pentagastrina via subcutânea na dose de 0,5 mg/kg e a histamina via subcutânea na dose de 25 mg/kg .

Após o tratamento, o procedimento foi realizado como descrito no item 2.3.

3 - Resultados

3.1 - Atividade Antiulcerogênica induzida por Etanol

No modelo de úlcera induzida por etanol, tanto o EEPV quanto o EEG6 apresentaram atividade antiulcerogênica significativa e dose-dependente. O EEPV administrada oralmente nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg apresentou porcentagens de inibição do ILU (índice de lesões ulcerativas) de 57, 74 e 92% respectivamente enquanto o EEG6 administrada nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg apresentou porcentagens de inibição do ILU de 89, 91 e 94% respectivamente. A carbenoxolona (200 mg/kg), controle positivo, apresentou porcentagens de inibição do ILU de 92% (Tabela 8 e figura 18).

Tabela 8: Determinação do índice de lesões ulcerativas.

<i>Tratamento</i>	<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>ILU (média±dp)</i>	<i>Inibição do ILU %</i>
NaCl 0,9%	-----	90,7 ± 29,8	-----
CBX	200	6,8 ± 3,34*	92
EEPV	100	38,8 ± 15,4*	57
EEPV	200	23,8 ± 9,8	74
EEPV	300	8,2 ± 3,74*	92
EEG6	50	10,0 ± 5,14*	89
EEG6	100	8,2 ± 2,86*	91
EEG6	150	5,75 ± 0,5*	94

* p<0,001, em relação ao grupo NaCl 0,9% (ANOVA).

3.2 - Atividade Antiulcerogênica: Triagem do Mecanismo de Citoproteção.

1 - Estudo da Participação das Substâncias Sulfidrílicas não Proteicas na Citoproteção Gástrica

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de N-etilmaleimida (NEM) as porcentagens de inibição do ILU dos extratos EEG6 (50 mg/kg) e EEPV (70 mg/kg) foram respectivamente 91,3 e 94,3%, enquanto o grupo sem o tratamento prévio a redução foi de 89,8 e 63,8% (tabela 9).

Tabela 9: Determinação do índice de lesões ulcerativas na avaliação da participação das substâncias sulfidrílicas na citoproteção gástrica.

<i>Tratamento</i>	<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>ILU (média±dp)</i>	<i>Inibição do ILU %</i>
NaCl 0,9%	-----	85 ± 18,7	-----
NaCl 0.9% + NEM	-----	115,5 ± 13,2	-----
EEPV	70	31 ± 24,5*	63,8
EEPV + NEM	70	6,2 ± 3,1*	94,6
EEG6	50	8,75 ± 2,8*	89,8
EEG6 + NEM	50	10 ± 1,85*	91,3

* p<0,001, em relação ao grupo NaCl 0,9% e NaCl 0,9%+NEM. (ANOVA).

2 - Estudo da Participação de Prostaglandinas na Citoproteção Gástrica

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de indometacina (5 mg/Kg , ip), as porcentagens de inibição do ILU dos extratos EEG6 (50 mg/kg) e EEPV (70 mg/kg) foram respectivamente 83,4 e 76,7%, enquanto o grupo sem o tratamento prévio a redução foi de 89,4 e 50% (tabela 10).

Tabela 10: Determinação do índice de lesões ulcerativas na avaliação da participação das prostaglandinas na citoproteção gástrica.

<i>Tratamento</i>	<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>ILU (média±dp)</i>	<i>Inibição do ILU %</i>
NaCl 0,9%	-----	82 ± 20,1	-----
NaCl 0,9%+ INDO	-----	104,6 ± 18,2	-----
EEPV	70	41,4 ± 24,7*	50
EEPV + INDO	70	24,4 ± 9,5*	76,7
EEG6	50	8,75 ± 4,42*	89,4
EEG6 + INDO	50	17,4 ± 13,1*	83,4

* p<0,001, em relação ao grupo NaCl 0,9% e NaCl 0,9% +Indo. (ANOVA).

3 - Estudo da Participação do Óxido Nítrico na Citoproteção Gástrica.

No modelo de úlcera induzida por etanol absoluto, com administração prévia de L-NAME (5 mg/Kg), as porcentagens de inibição do ILU extratos EEG6 (50 mg/kg) e EEPV (70 mg/kg) foram respectivamente 90,3% (50 mg/kg) e 60,3% (70 mg/kg), enquanto o grupo sem o tratamento prévio a redução foi de 90,6 e 66,1% (Tabela 11).

Tabela 11: Determinação do índice de lesões ulcerativas na avaliação da participação do óxido nítrico na citoproteção gástrica.

<i>Tratamento</i>	<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>ILU (média±dp)</i>	<i>Inibição do ILU %</i>
NaCl 0,9%	-----	59 ± 9,8	-----
NaCl 0,9% + L-NAME	-----	90,8 ± 15,8	-----
EEPV	70	20 ± 10,1*	66,1
EEPV + L-NAME	70	36,2 ± 6,94*	60,3
EEG6	50	7,0 ± 11,6*	90,6
EEG6 + L-NAME	50	17,4 ± 5,1*	90,3

* p<0,001, em relação ao grupo NaCl 0,9% e NaCl 0,9% +L-NAME. (ANOVA).

Os valores de ILU, não foram alterados significativamente para nenhum dos mecanismos avaliados sugerindo então, uma outra via de ação desses extratos, como a inibição da secreção gástrica.

3.3 - Atividade Antisecretória do EEPV e EEG6

No modelo de ligadura do piloro, ambos os extratos brutos EEG6 e EEPV, administradas por via intraduodenal, nas doses de 50 mg/Kg e 70 mg/kg , reduziram o

volume da secreção gástrica em 37,7 e 33% respectivamente enquanto que a cimetidina (100 mg/Kg) utilizada como controle positivo, reduziu em 39,7% o volume da secreção gástrica.

A concentração de íons H^+ também foi reduzida pela administração de ambos os extratos: 44,8% para EEG6 e 60,3% para EEPV. A cimetidina (100 mg/Kg) reduziu a concentração de íons H^+ em 78,4%. Os resultados, expressos como média $\pm$ desvio padrão da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H^+ estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Efeito da administração intraduodenal de EEPV e EEG6 em modelo de ligadura do piloro em ratos.

<i>Tratamento</i>	<i>Dose(mg/Kg)</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>H⁺(mEq/L)</i>
NaCl 0,9%	-----	4,5 $\pm$ 1,67	58,7 $\pm$ 30,6
Cimetidina	100	2,71 $\pm$ 1,22*	9,3 $\pm$ 6,4*
EEPV	70	3,0 $\pm$ 0,55*	23,3 $\pm$ 12,1*
EEG6	50	2,8 $\pm$ 0,61*	32,4 $\pm$ 14,2*

* p<0,001, em relação ao grupo NaCl 0,9% (ANOVA).

3.4 - Atividade anti-secretória dos extratos etanólicos (EEPV) e (EEG6) em ratos estimulados com os secretagogos betanecol (B), pentagastrina (P) e histamina (H)

Betanecol: Quando comparados com o grupo NaCl 0,9%, os grupos tratados com EEPV (70 mg/kg), e EEG6 (50 mg/kg), reduziram significativamente o volume da secreção gástrica em 42% e 61%, e a concentração de íons H^+ em 54% e 69%, respectivamente. Já quando comparados os grupos NaCl 0,9% + B com os grupos EEPV + B e EEG6 +B, somente o EEPV foi capaz de reduzir significativamente em 37% o volume e em 43,1% a concentração de íons H^+ . Os resultados, expressos como média $\pm$ erro da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H^+ , estão demonstrados na tabela 13.

Tabela 13: Efeito da administração intraduodenal de EEPV e EEG6: em modelo de ligadura do piloro em ratos tratados previamente com Betanecol.

Tratamento	Dose (mg/Kg)	Volume (ml)	$H^+(mEq/L)$
NaCl 0,9%	-----	$5,7 \pm 0,53$	39 ± 6
NaCl 0,9% + B		$8,0 \pm 0,81$	$57 \pm 8,7$
EEPV	70	$3,3 \pm 0,2^*$	$18 \pm 3,7^*$
EEPV+ B	70	$5,0 \pm 0,5^*$	$32,4 \pm 2,8^*$
EEG6	50	$2,21 \pm 0,09^*$	$12 \pm 1,9^*$
EEG6+ B	50	$7,7 \pm 0,62$	$52 \pm 6,7$

* $p < 0,001$, em relação ao grupo NaCl 0,9% NaCl 0,9%+B. (ANOVA).

Pentagastrina: Quando comparados com o grupo NaCl 0,9%, os grupos tratados com EEPV (70 mg/kg), e EEG6 (50 mg/kg), reduziram significativamente o volume da secreção gástrica em aproximadamente 42% e 37%, e a concentração de íons H^+ em 60% e 51%, respectivamente. Já quando comparados os grupos NaCl 0,9% + P com os grupos EEPV + P e EEG6 +P, a redução foi de 55% e 51% para o volume e 47% e 66% para

concentração de íons H^+ . Os resultados, expressos como média $\pm$ erro da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H^+ , estão demonstrados na tabela 14.

Tabela 14: Efeito da administração intraduodenal de EEPV e EEG6: em modelo de ligadura do piloro em ratos tratados previamente com Pentagastrina.

<i>Tratamento</i>	<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>H⁺ (mEq/L)</i>
NaCl 0,9%	-----	4,83 $\pm$ 0,79	51 $\pm$ 7,9
NaCl 0,9% + P		9,58 $\pm$ 1*	91,6 $\pm$ 4,85*
EEPV	70	2,8 $\pm$ 0,25*	20 $\pm$ 48*
EEPV+ P	70	4,3 $\pm$ 0,3*	48 $\pm$ 6*
EEG6	50	3 $\pm$ 0,20*	25 $\pm$ 3*
EEG6+ P	50	4,7 $\pm$ 1,05*	31 $\pm$ 8,8*

* $p < 0,001$, em relação ao grupo NaCl 0,9% e NaCl 0,9%+P. (ANOVA).

Histamina: Quando comparados com o grupo NaCl 0,9%, os grupos tratados com EEPV (70 mg/kg), e EEG6 (50 mg/kg), reduziram significativamente o volume da secreção gástrica em 51 e 40%, e a concentração de íons H^+ em 66 e 59%, respectivamente. Já quando comparados os grupos NaCl 0,9% + H com os grupos EEPV + H e EEG6 +H, a redução foi de 53 e 52% para o volume e 47 e 31% para concentração de íons H^+ . Os resultados, expressos como média $\pm$ erro da média do volume da secreção gástrica e da concentração de íons H^+ , estão demonstrados na Tabela 14.

Tabela 14: Efeito da administração intraduodenal de EEPV e EEG6: em modelo de ligadura do piloro em ratos tratados previamente com Histamina

<i>Tratamento</i>	<i>Dose (mg/Kg)</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>H⁺(mEq/L)</i>
NaCl 0,9%	-----	4,7 $\pm$ 0,16	14,7 $\pm$ 0,97
NaCl 0,9% + H		6,5 $\pm$ 0,64*	32,0 $\pm$ 4,7*
EEPV	70	2,3 $\pm$ 0,23*	5,0 $\pm$ 1,12*
EEPV+ H	70	3 $\pm$ 0,18*	17,0 $\pm$ 1,87*
EEG6	50	2,8 $\pm$ 0,11*	6,2 $\pm$ 1,42*
EEG6+ H	50	3,1 $\pm$ 0,17*	22,7 $\pm$ 2,32*

* $p < 0,001$, em relação ao grupo NaCl 0,9% e NaCl 0,9% + H. (ANOVA).

4 - Discussão

A ocorrência de gastrite e úlcera péptica é muito freqüente na população humana e apesar dos avanços na terapêutica, atualmente sua incidência está entre 3-10% da população. Estresse, fumo, deficiência nutricional, álcool e a ingestão de antiinflamatórios não-esteroidais (AINE) contribuem para o aumento da doença, incluindo a presença de *Helicobacter pylori* (Barros, 2007).

As drogas antiulcerogênicas basicamente atuam por estímulo dos fatores citoprotetores ou por diminuição da secreção ácida estomacal (Bighetti e col., 2005). Vários estudos têm demonstrado que diferentes variedades de própolis possuem participação na cicatrização de úlceras através da citoproteção gástrica e regeneração tecidual, bem como através da diminuição da acidez estomacal, atividades estas possivelmente relacionadas com a ação antioxidante das própolis (Havsteen, 2002; Barros, 2007; Barros 2008).

Sendo assim, os extratos EEPV e EEG6 foram avaliados quanto à capacidade de inibir a formação de úlceras, através desses dois mecanismos.

No modelo experimental de úlcera induzida por etanol, mesmo utilizando doses consideradas baixas, tanto EEPV quanto EEG6 apresentaram porcentagens de inibição bastante significativas. O *etanol* é considerado um agente irritante da mucosa gástrica que promove a depleção de radicais sulfidrílicos não protéicos (glutathione), encontrados em grande quantidade no estômago com destacado papel na citoproteção neutralizando os radicais livres (Oliveira e col., 2004).

O EEPV, administrado nas doses de 100 mg/kg , 200 mg/kg e 300 mg/kg inibiu o ILU em 57, 74 e 92%, respectivamente. O EEG6 nas doses de 50 mg/kg , 100 mg/kg e 150

mg/kg inibiu o ILU em 89, 91 e 94% enquanto que o controle positivo (carbenoxolona) na dose de 200 mg/kg inibiu em 92% (tabela 8).

A *carbenoxolona sódica*, utilizada como controle positivo, possui como mecanismo de ação um aumento dos níveis de prostaglandina na mucosa gástrica o que consequentemente promove um aumento na produção de muco e bicarbonato garantindo uma melhor proteção contra o ácido clorídrico e a pepsina (Lewis and Hanson, 1991; Asl, 2008).

Os resultados apresentados pela administração oral dos extratos das própolis sugeriram uma capacidade desses produtos, em estimular os fatores citoprotetores da mucosa gástrica, uma vez que protegeram o estômago contra a ação do etanol como faria a glutathione.

O fato dos extratos serem ricos em flavonóides reforça essa afirmação. Princípios ativos originários de plantas como alguns flavonóides, presentes também em uma grande variedade de própolis revelaram ação antiulcerogênica a partir de propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras e feridas (Batista e col., 2003).

Para confirmação de que esses extratos estariam envolvidos no mecanismo de citoproteção gástrica, o EEPV (70mg/kg) e EEG6 (50mg/kg) foram avaliados quanto à participação de substâncias envolvidas nesse processo.

O primeiro mecanismo avaliado foi a participação dos grupos sulfidrilas não proteicos encontrados em quantidades elevadas na mucosa gástrica. A participação de substâncias sulfidrílicas não-proteicas (glutathione reduzida) na citoproteção gástrica está relacionada com a atividade antioxidante que impede a ação de radicais livres tóxicos sob a mucosa e diminui a permeabilidade vascular (Szabo, 1981; Popovic, 2009).

Nesse modelo experimental metade dos grupos dos animais foram previamente tratados com agente alquilante das substâncias sulfidrílicas não proteicas, a N-etilmaleimida (NEM), e a outra metade não. Esta substância ocasiona a inativação das substâncias sulfidrílicas não proteicas e conseqüentes perdas da capacidade antioxidante (Takeuchi e col., 1989; Arrieta, 2003).

Ambos os grupos tratados e não tratados com NEM separados em novos grupos, receberam EEPV ou EEG6, nas doses de 70 e 50 mg/kg respectivamente. Os resultados mostraram que os extratos mantiveram sua atividade, sugerindo que este grupo de substâncias não está envolvido na ação antiulcerogênica observada (tabela 9).

A segunda hipótese avaliada foi a interferência das Prostaglandinas, que possuem um papel vital de proteção através da estimulação da secreção de bicarbonato e muco, manutenção do fluxo sangüíneo da mucosa e regulação da renovação e proteção das células da mucosa (Batista e col., 2004, Schubert, 2008).

Nesse modelo experimental metade dos grupos dos animais foram previamente tratados com Indometacina (AINE), que inibe a enzima ciclooxigenase envolvida na síntese de prostaglandina, e a outra metade não. Ambos os grupos, tratados e não tratados com indometacina, separados em novos grupos, receberam EEPV ou EEG6, nas doses de 70 e 50 mg/kg respectivamente. Os resultados mostraram também que os extratos mantiveram sua atividade, sugerindo que este grupo de substâncias não está envolvido na ação antiulcerogênica observada (tabela 10).

A participação do Óxido Nítrico na citoproteção gástrica foi o último mecanismo de citoproteção avaliado. O seu efeito citoprotetor se dá por promover vasodilatação e conseqüentemente um aumento do fluxo sangüíneo na mucosa gástrica, acelerando a

retirada dos íons H^+ e aumentando o aporte de nutrientes para a mesma (Kato e col., 1998; Arrieta e col., 2003).

Para esta avaliação, os animais foram previamente tratados com L-Name, inibidor da NO sintase e consequentemente da participação do óxido nítrico na citoproteção gástrica. Ambos os grupos, tratados e não tratados com L-Name, separados em novos grupos, receberam EEPV ou EEG6, nas doses de 70 e 50 mg/kg respectivamente. Novamente os resultados sugerem que este grupo de substâncias não está envolvido na ação antiulcerogênica observada (tabela 11).

A partir dos resultados obtidos, buscou-se então avaliar a atividade antissecretória das própolis através do modelo de ligadura de piloro. Este método desenvolvido por Shay e col. (1945) induz a hipersecreção de ácido por reflexo vagal, estimulado pela ligadura das fibras sensitivas da parede gástrica, o que aumenta o tônus muscular e a secreção ácida gástrica (Nagy e col., 1978).

Após o tratamento intraduodenal com EEPV e EEG6, nas doses de 70 e 50 mg/kg, o volume do conteúdo gástrico e a concentração de íons H^+ foram reduzidos significativamente quando comparados com o grupo controle (salina) (tabela 12). Esses resultados comprovam uma ação sobre a secreção gástrica, sugerindo ser essa a via de ação desses extratos.

Embora a incidência de úlcera péptica não seja necessariamente associada a alterações da secreção gástrica (HCl e pepsina), um dos principais mecanismos antiulcerogênicos descritos na literatura é a redução desses elementos agressores da mucosa gástrica (Guaraldo, 2001). Atualmente as drogas mais eficientes no tratamento de gastrite e úlcera gástrica atuam através da diminuição da secreção ácida, dentre elas bloqueadores dos receptores H_2 como a ranitidina e famotidina, anticolinérgicos como a pirenzepina e

telezepina e os bloqueadores de bomba de prótons como o omeprazol e lansoprazol (Rao e col., 2004).

Como as doses de ambas as própolis utilizadas para este experimento foram inferiores à dose da cimetidina, e mesmo assim apresentaram atividade antissecreatória potente, a continuidade desse estudo foi muito importante para esclarecer o mecanismo dessa atividade.

Na secreção gástrica estão envolvidos mediadores como histamina, gastrina e acetilcolina (Hoogerwerf & Pasricha, 2003). Visando identificar a via reguladora da secreção gástrica, ambos os extratos foram avaliadas no modelo de ligadura de piloro, agora tendo a secreção estimulada pelos secretagogos fisiológicos: histamina, betanecol e pentagastrina.

O tratamento prévio dos animais com EEPV (70 mg/kg) reduziu em 37% o volume e 43,8% a concentração de íons H^+ quando estimulados pela injeção de betanecol (1,5 mg/kg ,ip). Já para EEG6 os resultados não foram significativos (tabela 13).

O *Betanecol* é um agonista seletivo para receptores muscarínicos, que estão envolvidos no aumento da secreção ácida gástrica (Angus & Black, 1982). Uma possível ação antagonista do EEPV sobre as ações estimulantes do betanecol na secreção ácida gástrica sugere uma atividade bloqueadora dos receptores muscarínicos. M1 “neurais” encontrados principalmente nos neurônios do SNC e periféricos, bem como nas células parietais gástricas (Rang, 2004).

O tratamento prévio dos animais com EEPV e EEG6, reduziu em 55 e 51% volume e 47 e 64% a concentração de íons H^+ respectivamente, quando estimulados pela injeção de pentagastrina (0,5 mg/kg , sc). A redução foi significativa para ambos os grupos quando comparados com o grupo salina também estimulado pela pentagastrina (tabela 14).

A ***Pentagastrina*** é a extremidade funcional da molécula de gastrina, onde foi acrescentada uma β -alanina substituída. Este composto age sobre os receptores CCK-B de gastrina presentes na célula parietal, aumentando a liberação de ácido gástrico e também estimulando a secreção de histamina das células enterocromafins (Hersey & Sachs, 1995).

O tratamento prévio dos animais com EEPV e EEG6, reduziu em 53 e 52% o volume e 47 e 31% a concentração de íons H^+ respectivamente, quando estimulados pela injeção de histamina (25 mg/kg , sc). A redução foi significativa para ambos os grupos quando comparados com o grupo salina também estimulado pela histamina (tabela 15).

A ***Histamina*** estimula a secreção ácida gástrica, através de estimulação dos receptores H_2 presentes nas células parietais da mucosa gástrica (Black e col., 1972; Hersey & Sachs, 1995).

Os resultados desses três ensaios sugerem uma ação antagonista direta do EEPV e EEG6 sobre receptores muscarínicos (somente EEPV), receptores CCK-B de gastrina e também receptores de H_2 presentes nas células parietais, e ainda sugerem uma ação indireta através da inibição da liberação de histamina das células enterocromafins (ECL) parácrinas e mastócitos que resultaria na inibição da secreção gástrica. A célula parietal possui receptores H_2 para histamina, receptores M_2 muscarínicos para acetilcolina e receptores para gastrina. A estimulação dos receptores de H_2 aumenta cAMP, enquanto a estimulação dos receptores M_2 e de gastrina, o Ca^{+2} do citosol. Esses mensageiros intracelulares atuam de modo sinérgico para produzir a secreção ácida. A gastrina e a acetilcolina podem atuar diretamente sobre seus receptores (hipótese de *célula única*) ou em parte indiretamente através da liberação da histamina (hipótese de *duas células*) (Black & Shankley, 1987; Soll & Berglindh, 1987; Sandvik & Waldrum, 1991).

A secreção ácida gástrica é finamente regulada por vias interdependentes que incluem o sistema nervoso central, o sistema nervoso entérico e uma intrincada rede de células neuroendócrinas e imunes, que atuam na modulação parácrina e hormonal. A interação da histamina, gastrina e acetilcolina com seus receptores nas células parietais são os principais responsáveis pela ativação da bomba de prótons, enzima secretadora de H^+ (H^+ , K^+ - ATPase) que confere o pH ácido ao suco gástrico. Assim, uma ação inibidora dos extratos brutos em qualquer nível da estimulação da secreção ácida, poderia levar a proteção gástrica por diminuir os fatores agressores da mucosa (Schubert, 2008).

As drogas mais utilizadas atualmente para o tratamento das dispepsias funcionais (inibidores de bomba ou antagonistas H_2) apresentam um mecanismo de ação único ou majoritário, que leva a redução da secreção ácida gástrica. Em suma, os antagonistas H_2 inibem a secreção gástrica de ácido provocada pela histamina e por outros agonistas de H_2 de modo dependente da dose e competitivo e também inibem a secreção gástrica provocada pela gastrina e acetilcolina contribuindo assim para a acentuada eficácia clínica destes agentes. Reduzem tanto o volume do suco gástrico como a concentração de H^+ (Schubert, 2008).

Fármacos utilizados como inibidores da secreção gástrica como a *cimetidina* e *ranitidina* são antagonista dos receptores H_2 de histamina, mas atuam inibindo a secreção de ácido gástrico estimulada pela histamina, gastrina e acetilcolina; a secreção de pepsina também cai com a redução no volume de suco gástrico. Além disso, promovem a cicatrização das úlceras duodenais evidenciando uma ação generalizada (Rang e col., 2004).

A ação geral dos extratos EEPV e EEG6 sobre os receptores citados acima pode estar ligada ao fato de se tratarem de extratos brutos possuindo assim, grande quantidade de compostos que poderiam agir de formas distintas.

Diferentes variedades de própolis já foram avaliadas quanto à atividade antiulcerogênica revelando propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras, feridas, hepatoproteção, atividades estas possivelmente relacionadas com a ação antioxidante da própolis, além de atividades específicas como diminuição significativa no número de lesões, redução do volume de secreção gástrica, aumento do pH e redução da acidez estomacal (Cardinale e col., 2003; Barros e col., 2008).

Apesar da ampla utilidade desse produto, comprovada também para os extratos aqui avaliados, outros aspectos devem ser levados em consideração. A toxicidade observada no ensaio de toxicidade aguda foi controlada utilizando-se doses baixas, mas ativas, que a princípio não demonstraram serem tóxicas para os animais. No entanto não pode ser descartada a hipótese de uma possível toxicidade dos extratos principalmente para EEG6, sobre o trato gastrointestinal dos animais, especificamente sobre as células parietais da mucosa oxíntica que produzem ácido clorídrico; células do tipo enterocromafins (ECL) da mucosa oxíntica, que produzem a histamina (principal estimulante parácrino da secreção ácida); as células G da mucosa antral, que produzem a gastrina (principal estimulante hormonal da secreção ácida) e as células D da mucosa oxíntica e antral, que produzem a somatostatina (principal inibidor parácrino da secreção ácida) (Schubert, 2008).

Uma lesão a esses tipos celulares promovidos por uma possível ação citotóxica dos extratos levaria a uma redução da secreção gástrica. Por esse motivo, a importância de estudos complementares se faz necessária.

O potencial natural encontrado nos países latino-americanos, principalmente no Brasil, aliado à diversidade de compostos bioativos têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas na produção de fitoterápicos, uma vez que a utilização desses produtos atinge um público cada vez maior. Mas como ponto negativo, esse aumento no emprego dos produtos naturais traz consigo seu uso indiscriminado sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico, o que é fato preocupante e também chama a atenção dos pesquisadores em todo país (Calixto, 2005).

Diferentes variedades de própolis são consumidas amplamente pela população para o tratamento de uma série de afecções, sem mesmo ser avaliado seu perfil de atividade, bem como de toxicidade. Foi confirmado no presente trabalho diferenças na atividade farmacológica de duas variedades de própolis brasileira, bem como da toxicidade das mesmas.

Os resultados obtidos através desses estudos, aliados à identificação química dos compostos das própolis, enriquecem ainda mais o trabalho e o valor comercial desses produtos, servindo como caminho para o desenvolvimento de novas drogas. Esse trabalho multidisciplinar ressalta a importância de novos estudos complementares tanto na área acadêmica quanto por setores industriais relacionados ao desenvolvimento de novos fármacos, para que todas essas informações não sejam perdidas.

Conclusões Gerais

- ❖ Os extratos brutos EEPV e EEG6 apresentaram atividade antiproliferativa *in vitro* com perfil semelhante de ação, sobre as células tumorais.
- ❖ Os animais tratados com EEPV apresentaram sobrevida e inibição do desenvolvimento tumoral nos modelos de tumor de Ehrlich.
- ❖ Os animais tratados com EEG6 demonstraram sinais de toxicidade não sendo possível verificar uma ação antitumoral.
- ❖ O fracionamento do EEPV levou a identificação de dois compostos isolados com maior potencial de atividade antiproliferativa em relação ao EEPV e suas frações: C1 (Benzofenona Prenilada) e C2 (Vestitol). O composto C1 apresentou uma atividade mais significativa sobre todas as linhagens celulares.
- ❖ O Fracionamento do EEG6 originou a fração fr-HexG6 e o composto isolado C3 (Hiperibone A), que apresentaram perfil semelhante de ação *in vitro*.
- ❖ A administração de 200mg/kg do EEPV reduziu o edema de orelha induzido por óleo de cróton, evidenciando uma ação antiinflamatória local.
- ❖ A administração de 200mg/kg do EEPV reduziu o edema de pata induzido por carragenina evidenciando uma ação antiinflamatória sistêmica e inespecífica.
- ❖ A administração do EEG6 não apresentou atividade antiinflamatória em nenhum dos modelos avaliados.
- ❖ No modelo experimental de úlcera induzida por etanol, mesmo utilizando doses consideradas baixas, tanto EEPV quanto EEG6 apresentaram porcentagens de inibição das lesões ulcerativas (ILU) bastante significativas.

- ❖ A atividade antiulcerogênica dos EEPV e EEG6 esta relacionada à atividade antisecretória.

Referências Bibliográficas

- Alberts, B. **Biologia Molecular da célula**. 5° ed. New York: Garland Science, 2008.
- Alcici, N.M.F. Heavy metals in propolis: practical and simple procedures to reduce the lead in the Brazilian propolis. **Chemical Abstracts**, 127:236-237, 1996.
- Alencar S.M, Oldoni T.L, Castro M.L, Cabral I.S, Costa-Neto C.M, Cury J.A, Rosalen P.L, Ikegaki M. J. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **J.Ethnopharmacol.**, 113(2):278-83, 2007.
- Alencar, Severino Matias de. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. Campinas, 2002, 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- Allen, A., Flemström, G.; Garner, A., Kivilaakso, E. Gastroduodenal mucosal protection. **Physiol. Rev.**, 73, 823-857, 1993.
- Aller, M.A.; Arias, J.L; Arias, J.I.; Sánchez-Patán, F.; Arias, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, 12(10): 225-234, 2006.
- Alvarez E.O. The role of histamine on cognition. **Behav Brain Res.**, 199(2):183-9, 2009.
- Alwani, M. E.; Wu, B. X.; Obeid, L. M.; Hannun, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, 112: 171–183, 2006.
- Amagase, K., Okabe, S. On the Mechanism Underlying Histamine Induction of Gastric Mucosal Lesions in Rats with Partial Gastric Vascular Occlusion. **Journal of Pharmacological Sciences** : 607-8414; 2003.
- Amin AR, Kucuk O, Khuri FR, Shin DM. Perspectives for cancer prevention with natural compounds. **J Clin Oncol.**, 27(16):2712-25, 2009.
- Andrade M, Riul da Silva S. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. **Rev Bras Enferm**, 60(3):331-5, 2007.
- Angus, J.A.; Black, J.W. The interaction of choline esters, vagal stimulation and H2 receptor blockade on acid secretion in vivo. **Eur J Pharmacol.**, 80: 217-224, 1982.
- Arai, S.; Nishizaki, Y.; Kimoto, T.; Kurimoto, M. Antitumor agent. **United States Patent**, 5.710.179, 1998.

- Arai, S.; Nishizaki, Y.; Kimoto, T.; Kurimoto, M. Antitumor agent. **United States Patent, 5.710.179**, 1998.
- Arrieta, J.; Benitez J.; Flores E.; Castilho, C.; Navarrete, A., 2003. Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterugium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons. **Planta Medica**, 69(10): 905-909.
- Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. **Phytother Res**. 22(6):709-24, 2008.
- Aso, K.; Kanno, S. I.; Tadano, T.; Satoh, S.; Ishikawa, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 27 (5): 727-730, 2004.
- Atay, S.; Tarnawski, A. S.; Dubois, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, 61 (3-4): 105-124, 2000.
- Awale, S.; Shrestha, S.P.; Tezuka, Y.; Ueda, J.Y.; Matsushige, K.; Kadota, S. Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, 68(6): 858-864, 2005.
- Awara WM, El-Sisi AE, El-Sayad ME, Goda AE. The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? **Pharmacol Res.**, 50(5):487-98, 2004.
- Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J. of Ethnopharmacol.**, 100(1/2):114-117, 2005.
- Bankova, V.; De Castro, S.L.; Marcucci, M.C. **Apidologie**, 31: 3-15, 2000.
- Barros MP, Lemos M, Maistro EL, Leite MF, Sousa JP, Bastos JK, Andrade SF. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **J Ethnopharmacol.**, 120(3):372-7, 2008.
- Barros, MP; Souza, JP.; Bastos, JK.; Andrade, SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **J. Ethnopharmacol.** 110: 567-571, 2007.
- Batista, L.M., Almeida, A.B.B., Magri, L.P., Toma, W., Calvo, T.R., Vilegas, W., Brito, A.R.M. Gastric Antiulcer Activity of *Syngonanthus arthrotrichus* Silveira. **Biol. Pharm. Bull.** 27 (3): 328-332, 2004.
- Bedick, J.C.; Pardy, R.L.; Howard, R.W.; Stanley, D.W. Insect cellular reactions to the lipopolysaccharide component of the bacterium *Serratia marcescens* are mediated by eicosanoids. **Journal of Insect Physiology**, 46: 1481-1487, 2000.
- Beecher, G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, 133(10): 3248-3254, 2003.

- Bergami-Santos P.C, Mariano M, Barbuto J.A.M. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. **Life Sciences**, 75: 245-255, 2004.
- Bianco R, Melisi D, Ciardiello, Tortora, G. Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets. **European Journal of Cancer**, 42: 290-294, 2006.
- Bighetti, A.E., Antonio, M.A., Kohon, L.K., Rehder, M.A., Foglio, M.A., Possenti, A., Vilela, L., Carvalho, J.E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania leavigata* Schult. **Bip. Phytomedicine**, 12:72-77, 2005.
- Bjørling-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. **Environ Health.**, 22;7:50, 2008.
- Black, J.W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R., Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. **Nature**, 236: 385-390, 1972.
- Black, J.W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R., Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. **Nature**, 236: 385-390, 1972.
- Bonassa EMA. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. In: Bonassa EMA, Santana TR. *Enfermagem em terapêutica oncológica*. **Atheneu**; p. 3-19, 2005.
- Borocelli, E., Chiavarini, M., Ballabeni, V., Barlocco, D., Vianello, P., Dal Piaz, V., Impicciatore, M., Study of the antisecretory and antiulcer mechanism of a new indenopyridazinone derivative in rats, **Pharmacological Research**, 35 (5), 1997.
- Borrelli, F.; Maffia, P.; Pinto, L.; Ianaro, A.; Russo, A.; Capasso, F.; Ialenti, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, 73:53-63, 2002.
- Boyanova, L.; Gergova, G.N.; Ikolov, R.D.; Erejian, S.; Lazarova, E.; Katsarov, N.; Mitov, I.; Krastev, Z. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology**, 54(5):481-483, 2005.
- Boyce JA. Eicosanoids in asthma, allergic inflammation, and host defense. **Curr Mol Med.**, 8(5):335-49, 2008.
- Brownson, D.M. e col. Flavonoid effect relevant to cancer. **J. Nutr.**, 132:3482-3489, 2002.
- Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. **Front Biosci.**, 14:1-18, 2009.
- Burdock, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chemical Toxicology**, 36: 347-363, 1998.

- Burian, M.; Geisslinger, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of AINE at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, 107(2):139 - 154, 2005.
- Cabral, I.S.R. Isolamento e identificação de compostos com atividade antimicrobiana da própolis vermelha. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ), Piracicaba, 2008.
- Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, 100: 131–134, 2005.
- Calixto, J. B.; Otuki, M. F.; Santos, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, 70:93 – 103, 2004.
- Cardile, V.; Panico, A.; Gentile, B.; Borrelli, F.R; Usso, A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. **Life Sciences**, 73 (8): 1027-1035, 2003.
- Cassileth B. Complementary therapies, herbs, and other OTC agents: vitamin D. **Oncology (Williston Park)**, 23(3):558, 2009.
- Castaldo, S. & Capasso, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, 73:1-6, 2002.
- Castro ML, Nascimento AM, Ikegaki M, Costa-Neto CM, Alencar SM, Rosalen PL. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorg Med Chem**. 17(14):5332-5, 2009.
- Castro, M.L.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Duarte, S.; Koo, H. **Quim. Nova**, 30, 1512, 2007.
- CCAC (Canadian Council on Animal Care). CCAC guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching, and testing. Canadian Council on Animal Care. Ottawa, Canadá, 1998.
- Chen, C. N.; Wu, C. L.; Shy, H. S.; Lin, J.K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, 66: 503-506, 2003.
- Cnubben, N.H.P.; Rietjens, I.M.C.M.; Nortelboer, H.; Zander, J.; BLADERSEN, P.J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 10:141-52, 2001.
- Costa LG, Giordano G, Guizzetti M, Vitalone A. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. **Front Biosci.**, 13:1240-9, 2008.
- Cragg GM and Newman DJ. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 72-79, 2005.

- Cunha, I. B. D. S.; Salomao, K.; Shimizu, M.; Bankova, V. S.; Custodio, A. R.; De Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 52 (5): 602-604, 2004.
- Dagli, M.L.Z.; Guerra, J.L.; Saldiva, P.H.N. An experimental study on the lymphatic dissemination of the solid Ehrlich tumor in mice. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 29: 97-103, 1992 a.
- Dagli, M.L.Z.; Soma, M.; Guerra, J.L. e col. Lymphatic dissemination in neoplasia: determination of nuclear volume and DNA content of primitive and regional lymph node Ehrlich tumor cells. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 29:267-2671, 1992b.
- De Barros MP, Sousa JP, Bastos JK, de Andrade SF. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Pharmacol Ther.**, 96(2-3):67-202, 2002.
- De Sousa Falcão H, Leite JA, Barbosa-Filho JM, de Athayde-Filho PF, de Oliveira Chaves MC, Moura MD, Ferreira AL, de Almeida AB, Souza-Brito AR, de Fátima Formiga Melo Diniz M, Batista LM. Gastric and duodenal antiulcer activity of alkaloids: a review.
- De Souza Pereira R. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors used for preventing or regressing cancer. **Recent Pat Anticancer Drug Discov.**, 4(2):157-63, 2009.
- Dembinski, A.; Warzecha, Z.; Ceranowicz, P.; BR. Dnerver and histamine, H1, H2 and H3 receptors in the gastroprotective effect of histamine against stress ulcer flavonoids with metal ions. **Redox. Rep.**, 9(2): 97-104, 2004.
- Devasagayam , T.P.; Tilak, J.C.; Bloor, K.K.; Sane, K.S.; Ghaskadbi, S.S.; L Ele ,R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v.52, p.794-804, 2004.
- Diaz, N.J.; Quevedo, A.O.; Luna, S.B. Determination of Fe, Mn, Zn, and Cu in an ethanolic extract of Cuban propolis. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, 28: 93- 95, 1997.
- Ekblad, E., Mei, Q., Sundler, F. Innervation of the Gastric Mucosal. **Microscopy Research and Technique**, 48:241-257; 2000.
- Fastaia, J. and Dumont, A. Pathogenesis of Ascites in Mice with Peritoneal Carcinomatosis. **Journal of the National Cancer Institute**, 56: 547-549, 1976.
- Fecchio D, Sirois P, Russo M, Jancar S. Studies on inflammatory response induced by Ehrlich tumor in mice peritoneal cavity. *Inflammation*, 14:125-131, 1990.
- Flemström, G.; Isenberg, JI. Gastroduodenal Mucosal Alkaline Secretion and Mucosal Protection. **News Physiol. Sci.**, 16: 23-28, 2001.
- Folkman, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Current Molecular Medicine**, 3: 643-651, 2003.

- Fonseca SM, Almeida EPM, Massunaga VM. Administração dos quimioterápicos. In: Fonseca SM, Machado RCL, Paiva DRS, Almeida EPM, Massunaga VM, Junior WR, e col. Manual de quimioterapia antineoplásica. Rio de Janeiro (RJ): Reichmann & Affonso, p. 16-9, 2000.
- Frey RS, Li J, Singletary KW. Effects of genistein on cell proliferation and cell cycle arrest in nonneoplastic human mammary epithelial cells: involvement of Cdc2, p21waf/cip1, p27kip1, and Cdc25C expression. **Biochem Pharmacol.** 61(8):979-89, 2001.
- Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. **Carcinogenesis.** 19(12):2151-8, 1998.
- Gamberini, M. T., Skarupa, L. A., Souccar, C. & Lapa, A. J. Inhibition of gastric secretion by a water extract from *Baccharis triptera*, Mart. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz** 86: Suppl. II, 137-138, 1991.
- Ghisalberti, E. L. Própolis: a review. **Bee World**, 60(2): 59-84, 1979.
- Goel A, Aggarwal P. Pesticide poisoning. **Natl Med J India.** 20(4):182-91, 2007.
- Greenaway, W.; May, J.; Scaybrook, T.; Watley, F.R. Identification by gas chromatography-mass of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, 46c: 111-121, 1991.
- Gupta M, Mazumder UK, Kumar RS, Sivakumar T, Vamsi ML. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **J Pharmacol Sci.**, 94(2):177-84, 2004.
- Ham M, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Opin Gastroenterol.**, 24(6):665-73, 2008.
- Harris RE. Cyclooxygenase-2 (COX-2) blockade in the chemoprevention of cancers of the colon, breast, prostate, and lung. **Inflammopharmacology.** 17(2):55-67, 2009.
- Hartveit F. The Immediate Cause of Death in Mice with Ehrlich's ascites carcinome. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, 65: 359-365, 1965.
- Hasebe, K.; Horie, S.; Yano, S.; Watanabe, K. Stimulatory effects of nitric oxide donors on gastric acid secretion in isolated mouse stomach., **Eur. J. Pharmacol.**, 420: 159-64, 2001.
- Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, 96(2/3), 67-202, 2002.
- Hawkins, C., Hanks, G.W. The Gastroduodenal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. A Review of the Literature. **J. Pain Symptom Management**, 20: 140-151, 2000.

- Hayashi A., Gillen A. C., Lott J. R., **Altern. Med. Rev.**, **5**: 546-552, 2000.
- Hehlgans S, Haase M, Cordes N. Signalling via integrins: Implication for cell survival and anticancer strategies. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1775:163-180, 2007.
- Hendriksen C.F.M., and D.B. Morton, editors. 1999. Humane Endpoints in Animal Experiments for Research. In: Proceedings of the International Conference, November 22- 25, 1998,
- Hersey, S.J., Sachs, G., Gastric acid secretion, **Physiological Reviews**, 75: 155-188, 1995.
- Hirschowitz, B.I.; Molina, E.. Effects of four H2 histamine antagonists on bethanechol-stimulated acid and pepsin secretion in the dog. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2:341-5, 1983.
- Holbeck SL. Update on NCI in vitro drug screen utilities. **European Journal of Cancer**, 40: 785-793, 2004.
- Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. **Cancer Res.** 58(17):3833-8, 1998.
- Ince I, Yesil-Celiktas O, Karabay-Yavasoglu NU, Elgin G. Effects of Pinus brutia bark extract and Pycnogenol((R)) in a rat model of carrageenan induced inflammation. **Phytomedicine**, 2009.
- Inoue K, Saito M, Kanai T, Kawata T, Shigematsu N, Uno T, Isobe K, Liu CH, Ito H. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line in vivo and in vitro. **Am J Chin Med.**,36(3):625-34, 2008.
- Instituto Nacional do Cancer (INCA), (2009). <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 03/08/2009.
- Ishikawa, M.; Kanno, S.; Asou, K.; Ogino, M.; Tadano, T.; Satou, S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by Propolis. **Journal of Pharmacological Sciences**, 94: 129-129, 2004.
- Itharat, A.; Houghton, P.; Amooquaye, E.; Burke, Pj.; Sampson, J.; Raman, A. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, 90: 33-39, 2004.
- Ito, J.; Chang, F.; Wang, H.; Park YK.; Ikegaki. M.; Kilgore. N; Lee K. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivates and the new melliferone related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, 64: 1278-81, 2001.
- Jemal, A.; Murray, T.; Ward, E.; Samuels, A; Tiwari, R.C.; Ghafoor, A; Feuer, E.J.; Thun, M. J. "Cancer Statistics, CA-A". **Cancer J. Clin.**, 55 (1):10, 2005.

- Johnson, K. S.; Eischen, F. A.; Giannasi, D. E. Chemical-compositing of North-American bee propolis and biological-activity towards larvae of greater wax moth (*Lepidoptera, Pyralidae*). **Journal of Chemical Ecology**, 20(7): 1783-1791, 1994.
- Jones, J.I.W.; Hawkey, C.J. Physiology and organ-related pathology of the elderly: **Stomach. Lif. Sci.**, 67:1095-1101, 2001.
- Barbosa-Filho, J. M.; Piuvezam M. R; Moura, M; Silva, M.; Batista, K. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 16(1): 109-139, 2006
- Kam, P.C.A.; See, A.U-L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anaesthesia**, 55:442-449, 2000.
- Kato, S.; Kitamura, M.; Korolkiewicz, R. P.; Takeuchi, K. Role of nitric oxide in regulation of gastric acid secretion in rats: Effects of NO donors and NO synthase inhibitor. **Br. J. Pharmacol.**, 123:839-46, 1998.
- Khalil ML Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pac J Cancer Prev.**, 7(1):22-31, 2006.
- Kimoto, T.; Chaen, H.; Kurimoto, M. Apoptosis-controlling agent. **United States Patent, 5.830.914**, 2001.
- Koeberle A, Northoff H, Werz O. Identification of 5-lipoxygenase and microsomal prostaglandin E2 synthase-1 as functional targets of the anti-inflammatory and anti-carcinogenic garcinol. **Biochem Pharmacol.**, 77(9):1513-21, 2009.
- Kohchi C, Inagawa H, Nishizawa T, Soma G. ROS and innate immunity. **Anticancer Res.** 29(3):817-21, 2009.
- Kolivas S, Shulkes A. Regulation of expression of the receptors controlling gastric acidity. **Regul Pept.**, 121(1-3):1-9, 2004.
- Konturek, S.J.; Cieszkowski, M.; Jaworek, J.; Konturek, J.; Brzozowski, T.; Gregory, H. Effects of epidermal growth factor on gastrointestinal secretions. **Am. J. Physiol.**, 246: 580-6, 1984.
- Koo, H.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Sattler, A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**, 33(5): 393-400, 1999.
- Korkina L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cell Mol Biol**, 53(1):15-25, 2007.
- Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, 64(3): 235-240, 1999.

- Kumar, V.; Cotran, R.S.; Schoen, F.J. Robbins – Patologia estrutural e funcional. Ed. Elsevier. 7a ed, 2005.
- Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, 84 (3): 329-339, 2004.
- Kuo P.L., Hsu Y.L., Lin T.C., Lin C.C. The antiproliferative activity of prodelpinidin B-2 3'-O-gallate from green tea leaf is through cell cycle arrest and Fas-mediated apoptotic pathway in A549 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 43: 315-323, 2005.
- Kutchai H. Secreções Gastrointestinais. In: Berne RM, Levy M. editores. Fisiologia. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 535-537.
- Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, 135(1):41-60, 2008.
- Lakatos G, Herszényi L, Tulassay Z.: The safety of COX-2 inhibitors. **Orv Hetil.**, 149(33):1539-47, 2008.
- Lapa, A.J.; Souccar, C.; Lima-Landman, M.T.R.; Castro, M.S.A.; Lima, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5ª. Ed – Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2008.
- Laskin, D.L.; Laskin, J.D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. **Toxicology**, **160**: 111-118, 2001.
- Lawrence NJ, McGown AT. The chemistry and biology of antimitotic chalcones and related enone systems. **Curr Pharm Des.**, 11(13):1679-93, 2005.
- Ledon, N.; Casaco, A.; Gonzalez, R.; Merino, N.; Gonzalez, A.; Tolon, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Acta Pharmacologica Sinica**, 18:274-276, 1997.
- Lewis, D.; Hanson, P.J. Anti-ulcer drugs of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry**, 28: 201-31, 1991.
- Lewis, D.A .& Hanson, P.J., Anti-ulcer drugs of plant origin, Progress in Medicinal Chemistry, 28, 1991. Levy, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Science**, 8: 601-606, 1969.
- Li Z, Li J, Mo B, Hu C, Liu H, Qi H, Wang X, Xu J. Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Toxicol In Vitro**, 22(7):1749-53, 2008.
- Lima B, Tapia A, Luna L, Fabani M.P, Schmeda-Hirschmann G, Podio NS, Wunderlin DA, Feresin GE. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). **J Agric Food Chem.** 57(7):2691-8, 2009.

- Lima Pereira, F.E.; Bogliolo, L. Inflamações. Etiopatogênese geral das doenças :20-45, 1994. Male D, Roitt I. Introdução ao sistema imune. Texto de imunologia 4ta ed. Por Roitt Brostoff, Male. Cap1.p:1.2-1.12, migração celular e inflamação. Cap 14p:14.2-14.8, 1994.
- Lipof, T.; Shapiro, D.; Kozol, R. A. Surgical perspectives in peptic ulcer disease and gastritis. **World Journal of Gastroenterology**, 20: 3248-3252, 2006.
- Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez de Castro I and Alonso FJ. Inhibition of Glutaminase Expression by Antisense mRNA Decreases Growth and Tumourigenicity of Tumour Cells. **Biochemical Journal**, 348: 257-261, 2000.
- Malone, M.H. Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**, Berlin: Springer-verlag, 1977. p. 24
- Manach, C.; Scalbert,A.; M Orand, C.; Remesy, C.; J Imenez,L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, 79(5): 727-747, 2004.
- Marcucci, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, 26: 83-99, 1995.
- Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Dantas, A. P.; Valente, P. H. M.; Paulino, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, 74 (2): 105-112, 2001.
- Masullo M, Bassarello C, Suzuki H, Pizza C, Piacente S. Polyisoprenylated benzophenones and an unusual polyisoprenylated tetracyclic xanthone from the fruits of *Garcinia cambogia*. **J Agric Food Chem.**, 56(13):5205-10, 2008.
- Matsumoto K, Akao Y, Kobayashi E, Ito T, Ohguchi K, Tanaka T, Iinuma M, Nozawa Y. Cytotoxic benzophenone derivatives from *Garcinia* species display a strong apoptosis-inducing effect against human leukemia cell lines. **Biol Pharm Bull.** 26(4):569-71, 2003.
- Matsuno, T. Propolis: its pharmacology and therapeutic effects. **Naturforsch.**, 50: 93-97, 1995.
- Mayer KD. The Pathogenicity of the Ehrlich Ascites Tumor. **British Journal of Experimental Pathology**, 47: 537-544, 1966.
- Mehrad B, Keane MP, Strieter RM. Division of Pulmonary and Critical Care Medicine. **Thromb Haemost.** 97(5):755-62, 2007.
- Melo OS, Justo GZ, Duran N, Haun M. Natural Killer cell activity and Anti-tumor effects of Dehydrocrotonin and its Synthetic Derivatives. **European Journal of Pharmacology**, 487: 47-54, 2004.

- Menezes, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, 72(3):405-411, 2005.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease and Cancer. **Pharmacological Reviews**, 52: 673-751, 2000.
- Mojzis, J.; Hegedusova, R.; Mirossay, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion-induced gastric mucosa injury in rats. **Physiol. Res.**, 49: 441-46, 2000.
- Montpied, P.; De Bock, F.; Rondouin, G.; Niel, G.; Briant, L.; Courseau, A. S.; Lerner-Natoli, M.; Bockaert, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular Brain Research**, 115 (2): 111-120, 2003.
- Moreno, M.I.; Isla, M.I.; Sampietro, R.A.; Vattuone, M.A. Comparison of free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journaf of Ethnopharmacology**, 71(1-2): 109-114, 2000.
- Morimoto, Y.; Shimohara, K.; Oshima, S.; Takayuki, S. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japanese Journal of Pharmacology** 57: 495-505, 1991.
- Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol.** 225:115-21, 2003.
- Morton DB, Griffiths PHM. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. **Veterinary Record** 116:431-436, 1985
- Morton DB. A systematic approach for establishing humane endpoints. **ILAR Journal** 41:80-86, 2000
- Mota KS, Dias GE, Pinto ME, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito AR, Hiruma-Lima CA, Barbosa-Filho JM, Batista LM. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules.**, 14(3):979-1012, 2009.
- Murata, R. M.; Koo, H.; Goncalves, R. B.; Cury, J. A.; Yatsuda, R.; Rosalen, P. L. Antimicrobial potential of propolis from brazilian regions against periodontopatogenic microorganisms. **Journal of Dental Research**, 82: 234-234, 2003.
- Myung SJ, Kim IH. Role of prostaglandins in colon cancer. **Korean J Gastroenterol**, 51(5):274-9, 2008.
- Nagai, T.; Inoue, R.; Inoue, H.; Suzuki, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, 80 (1): 29-33, 2003.

- Nagaoka T.; Banskota A.H.; Tezuka Y.A; Midorikawa K.; Matsushige K, Kadota S.H. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): potent nitric oxide inhibitor from the Netherlands propolis. **Biol. Pharm. Bull**, 26: 487-91, 2003.
- Nagy, L.; Mozsik, G.Y.; Tárnok, F.; Szalai, M.; Póth, I.; Jávör, T. Interrelationships between the gastric secretory responses, prostaglandin E2 inhibitor by catechins. **J. Pharm. Pharmacol.**, 44: 926-28, 1991.
- Nam, N.H.; Parang, K. Current targets for anticancer drug discovery. **Curr. Drug Target**, 4: 159-79, 2003.
- Nascimento FRF, Cruz GVB, Pereira PVS, Maciel MCG, Silva LA, Azevedo APS, Barroqueiro SB, Guerra RNM. Ascitic and Solid Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Treatment. **Life Sciences**, 78: 2650-2653, 2006.
- Negri, G.; Salatino, M. L. F.; Salatino, A. "Green propolis": unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research**, 42(3): 39-41, 2003.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, 66:1022-1037, 2003.
- Newton, J. Effect of age related changes in gastric physiology on tolerability of medications for older people. **Drugs Aging**, 22 (8):655-661, 2005.
- Nonato FR, Barros TA, Lucchese AM, Oliveira CE, dos Santos RR, Soares MB, Villarreal CF. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **J Ethnopharmacol.**, 17;125(1):102-7, 2009.
- Norel X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. **Scientific World Journal**, 7:1359-74, 2007.
- NRC [National Research Council]. 1992. **Recognition and Alleviation of Pain and distress in Laboratory Animals**. National Academy Press, Washington, DC
- O'Malley. Gastric ulcers and GERD: the new "plagues" of 21st century update for the clinical nurse specialist. **Clinical Nurse Specialist**, 17: 286-289, 2003.
- O'Donnell V.B, Maskrey B, Taylor G.W. Eicosanoids: generation and detection in mammalian cells. **J. Lipid Res.** 50:423-8, 2009.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2000. Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.

- Oketani, K.; Nagakura, N.; Harada, K.; Inoue, T. In vitro effects of E3040, a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and thromboxane A₂ synthetase, on eicosanoid production. **European Journal of Pharmacology**, 422: 209-216, 2001.
- Oldoni, T.L.C. Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis Mellifera*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ), Piracicaba, 2007.
- Oliveira RB, Alves RJ. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, 25(6): 976-984, 2002.
- Orsini, B.; Calabro, A.; Milani, S.; Grappone, C.; Herbst, H.; Surrenti, C. Localization of epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha receptor in the human gastric mucosa. An immunohistochemical and in situ hybridization study. **Anat. Histopathol.**, 423(1):57-63, 1993.
- Orsolić N, Basić I.J. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. **Ethnopharmacol.**, 102(1):37-45, 2005.
- Orsolić N, Kosalec I, Basić I Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. **Biol Pharm Bull.**, 28(4):694-700, 2005.
- Ozturk , F.; Kurt, E.; Cerci, M. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. **Ophthalmic Research**, 32:13-18, 2000.
- Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. **Physiology Reviews**, 87: 315 - 424, 2007.
- Parhar, R.S. & Lala, P.K. Prostaflandin e2-mediated inactivation of various killer lineage cells by tumor-bearing host macrophages. **J. Leukocyte Biology**, 44:474-484, 1988.
- Park, Y. K.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M.; Moura, F. F. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybe Science**, 21(2): 85-90, 2000.
- Park, Y. K.; Koo, M. H.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L. Effects of propolis on *Streptococcus mutants*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, 29: 143-148, 1998b.
- Park, Y. K.; Koo, M. H.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Abreu, J. A. S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, 36(1): 24-28, 1998a.
- Park, Y. K.; Paredes-Guzman, J. F. Aguiar, C. L.; Alencar, S. M.; Fujiwara, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern

- Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52 (5): 1100-1103, 2004
- Park, Y.K.; Koo, M.H.; Sato, H.H.; Contado, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 38: 1253-1259, 1995.
- Paulino N, Abreu SR, Uto Y, Koyama D, Nagasawa H, Hori H, Dirsch VM, Vollmar AM, Scremin A, Bretz WA. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **Eur J Pharmacol.**, 587(1-3):296-301, 2008.
- Pereira, A.D.; Pereira, A.F.D.; Trugo, L.C.; Neto, F.R.D. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift Fur Naturforschung C**, 58 (7-8): 590-593, 2003.
- Peters-Golden M. Expanding roles for leukotrienes in airway inflammation. **Curr Allergy Asthma**, 8(4):367-73, 2008.
- Pinto VL, Brunini TM, Ferraz MR, Okinga A, Mendes-Ribeiro AC. Depression and cardiovascular disease: role of nitric oxid. **Cardiovasc Hematol Agents Med Chem**. 6(2):142-9, 2008.
- Pommier, B.; Marie-Claire, C.; Da Nascimento, S.; Wang, H. L.; Roques, B. P.; Noble, F. Further evidence that the CCK2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis. **Journal of Neurochemistry**, 85: 454-461, 2003.
- Popovic M, Janicijevic-Hudomal S, Kaurinovic B, Rasic J, Trivic S. Antioxidant effects of some drugs on ethanol-induced ulcers. **Molecules**, 14(2):816-26, 2009.
- Pouli N, Marakos P. Fused xanthone derivatives as antiproliferative agents. **Anticancer Agents Med Chem.**, 9(1):77-98, 2009.
- Prinz, C.; Zanner, R.; Gratzl, M. Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. **Ann. Rev. Physiol.**, 65: 371–82, 2003.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination od antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. **J Agric Food Chem** 53: 4290-4302, 2005
- Qui, B.S., Mei, Q.B., Liu, L., Meng, K. Effects of Nitric Oxid on Gastric ulceration induced by nicotine and cold-restraint stress. **World Journal of Gastroenterology**, 10(4):594-597; 2004.
- Rang, H.P.; Dale, M.M. & Ritter, J.M. Fármacos Analgésicos. *In: Pharmacology*. 5ed. Churchill Livingstone, New York:p. 640-663, 2004.

- Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets.**, 8(3):229-35, 2009.
- Ravelo AG, Estévez-Braun A, Chávez-Orellana H, Pérez-Sacau E, Mesa-Siverio D. Recent studies on natural products as anticancer agents. **Curr Top Med Chem.**, 4(2):241-65. 2004.
- Ribeiro LR, Mantovani MS, Ribeiro DA, Salvadori DM. Brazilian natural dietary components (annatto, propolis and mushrooms) protecting against mutation and cancer. **Hum Exp Toxicol.**, 25(5):267-72, 2006.
- Roberts Ii, L. J.; Morrow, J. D. Analgésico-Antipiréticos, agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica. 10ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, p. 517 – 550, 2003.
- Rodriguez, S.; Ancheta, O.; Ramos, M.E. . Effect of Cuban red propolis on galactosamini-induced hepatitis in rats. **Pharmacological Research**, 35(1): 1-4, 1997.
- Rosalen, P. L.; Murata, R. M.; Yatsuda, R. Duarte, S.; Goncalves, R. B.; Koo, H.; Cury, J. A. Effect of propolis from eight Brazilian regions on oral microorganisms. **Journal of Dental Research**, 81: A349-A349, 2002.
- Russo, A.; Cardile, V.; Sancez, N.; Troncoso, N. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. **Life Sciences** 76: 545-558, 2004.
- Sahinler, N. & Kaftanoglu, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research**, 19(2):183-188, 2005.
- Salatino,A.;T Eixeira, E.W.; N Egri, G.; Message , D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence based Complementary and Alternative Medicine**, 2 (1): 33-38, 2005.
- Salgado Oloris, S.C.S, Dagli, M.L.Z, Guerra, J.L. Effect of β -carotene on the Development of the Solid Ehrlich Tumor in Mice. **Life Sciences**, 71: 717-724, 2002.
- Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Petrovick, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. 15: 301-332, 2001.
- Schneider C, Segre T. Green tea: potential health benefits. **Am Fam Physician.**, 79(7):591-4, 2009.
- Schneidewind, E. M.; Kala, H.; Linzer, B.; Metzner, J. Knowledge of constituents of propolis. **Pharmazie**, 30 (12): 803-803, 1975.

- Schubert M.L. Gastric secretion. **Curr Opin Gastroenterol.**, 24(6):659-64, 2008.
- Schubert, M.L. Gastric Secretion. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, 20:519-20, 2004.
- Schumbert, Mitchell. Gastric Secretion. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. 19(6):529-525, 2003.
- Setty, A.R.; Sigal, L.H. Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 34: 773 – 784, 2005.
- Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol.** 113(1):1-14, 2007.
- Sforcin, J.M.; Fernandes Junior., A.; Lopes, C.A.; Bankova, V.; Funari, S.R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 73(1-2):243-249, 2000.
- Shay, H.; Komarov, S. A.; Fels, S. E.; Meraze, D.; Gruenstein, M.; Siplet, H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in rat. **Gastroenterology**, 5: 43-61, 1945.
- Sherwood, E. R.; Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, 18: 385–405, 2004.
- Shiantarelli P, Cadel S, Acerbi D & Pavesi L. Anti-inflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneim.Forsch/Drug Research** 32(3): 230-235, 1982
- Shibuya, T.; Oku, K.; Aga, H.; Fukuda, S. Propolis extract. **United States Patent**, **6.153.228**, 2000.
- Shoemaker, R. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews**, 813-823, 2006.
- Silici, S. & Kutluca. S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, 99(1): 69-73, 2005.
- Silva, R.M.; Leme, G.J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: **International series of Monographs in Pure and Applied Biology**, Modern Trends in Physiological Sciences, 37: 1-47, 2006.
- Siqueira, J.F.; Dantas, C.J.S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. In: **Inflamação aguda: mediadores químicos**. Ed MEDSI Ltda., São Paulo: 83-105, 2000.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. **Journal of National Cancer Institute**, 82 (13): 1107-1118, 1990.

- Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK. An Evaluation of Cytotoxicity of the Taxane and Platinum Agents. Combination Treatment in a Panel of Human Ovarian Carcinoma Cell Lines. **Gynecologic Oncology**, 98: 141-145, 2005.
- Smith, ND; Rubenstein, JN; Eggener, SE, Kozlowski, JM. The p53 suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. **J.Urol.**, 169: 1219-1228, 2003.
- Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, FitzGerald GA. Prostanoids in health and disease. **J Lipid Res.**, 50:423-8, 2009.
- Snowden FM. Emerging and reemerging diseases: a historical perspective. **Immunol Rev.**, 225:9-26, 2008.
- Suggit, M. and Bibby, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research**, 11: 971-981, 2005.
- Szabo, S., Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 13: 21-34, 1991.
- Szabo, S.; Nagy, L., Pathways, mediators and mechanism of gastroduodenal mucosal injury, **Acta Physiologica Hungarica**, 80: 9-21, 1992.
- Takayama T, Goji T, Taniguchi T, Inoue A.J. Chemoprevention of colorectal cancer-experimental and clinical aspects. **Med Invest.**, 56(1-2):1-5, 2009.
- Takeuchi, K.; Ohuchi, T.; Miyake, H.; Niki, S.; Okabe, S. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on duodenal alkaline secretion in anesthetized rats. **European Journal of Pharmacology**, 231:135-8, 1993.
- Tarnawski A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig Dis Sci.**, 1:24-33, 2005.
- Tatemichi, M.; Ogura, T.; Sakurazawa, N.; Nagata, H.; Sugita, M. Roles of inducible nitric oxide syntase in the development and heling of experementally induced gastric ulcers. **Int. J. Exp. Patholo.**, 84 (50): 213-220, 2003.
- Tavares, Janaina. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico a base de associações de plantas, mel e própolis. **Rev. bras. farmacogn.** 16(3): 350-356, 2006.
- Teixeira, E.W.; Negri, G.; Meira, R.M.; Message, D.;Salatino, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2(1):85-92, 2005.
- Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, da Rocha Pasin FD, Tsvetkova I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med**, 3:249-54, 2006.

- Tubaro A, Dri P, Delbello G., Zilli C. and Loggia RD. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, 17:347-349, 1985.
- UKCCCR. **Guidelines on the Welfare of Animals Used in Experimental Neoplasia**. From PO Box 123, Lincoln Inn Fields, London WC2A 3PX, 1997
- Ullman-Culleré MH & Foltz CJ. Body Condition Scoring: A Rapid and Accurate Method for Assessing Health Status in Mice. **Laboratory Animal Science** **49(3)**:319-323, 1999
- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biol.** 5: 231-235, 1971.
- Vanegas, H.; Schaible, H. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, 64:327 - 363, 2001.
- Verçosa Junior, VD; Melo, M.M.; Cassali, G.D.; Dantas-Barros, A.M; Silva Junior P.G.P. Influência de *Agaricus blazei* Murrill sobre o tumor sólido de Ehrlich e linfonodos poplíteos de camundongos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 59(1):150, 2007.
- Vicent P.C and Nicholls A. Comparison of the Growth of the Ehrlich Ascites Tumor in Male and Female Mice. **Cancer Research**, 27: 1058-1065, 1967.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **J Food Sci.**, 73(9): 117-24, 2008.
- Wallace, J. L.; Granger, D. N. The cellular and molecular basis of gastric mucosal defense. **Faseb. Journal**, 10:731 - 740, 1996.
- Wallace, J. L. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. **American Journal of Medicine**, 110 (1A):19-23, 2001.
- Wallace JL. Prostaglandins, AINE, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol Rev.**, 88(4):1547-65, 2008.
- Weng, M.S.; Ho, Y.S.; Lin, J.K. Chrysin induces G1 phase cell cycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase. **Biochemical Pharmacology**, 69(12): 1815-1827, 2005.
- Whelton, A. Renal Aspects of Treatment with Conventional Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Versus Cyclooxygenase-2-Specific Inhibitors. **Am J Med**, 110 (3A): 33-42, 2001.
- WHO. Cancer Fact Sheet. **World Health Organization**. 297, 2006.
- Williams, R.J.; Spencer, J.P.; Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, 36(7): 838-849, 2004.

- Winter, C.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 111(3): 544, 1962.
- Xu G, Feng C, Zhou Y, Han QB, Qiao CF, Huang SX, Chang DC, Zhao QS, Luo KQ, Xu HX. Bioassay and ultraperformance liquid chromatography/mass spectrometry guided isolation of apoptosis-inducing benzophenones and xanthone from the pericarp of *Garcinia yunnanensis*. **J Agric Food Chem.**, 56(23):11144-50, 2008.
- Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. **Nat Rev Cancer**, 9(6):429-39, 2009.
- Yedgar, S.; Lichtenberg, D.; Schnitzer, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1488: 182-187, 2000.
- Zhao, C.M.; Chen, D.; De La Cour, C.D. Histamine and histidine decarboxylase are hallmark features of ECL cells but not G cells in rat stomach. **Regul. Pept.**, 118: 61–66, 2004.
- Zhao, C.M.; Chen, D.; Yamada, H. Rat stomach ECL cells: mode of activation of histidine decarboxylase. **Regul. Pept.**, 114: 21–27, 2003.
- Zhu A, Kaunitz J. Gastroduodenal mucosal defense. **Curr Gastroenterol Rep.**, 10(6):548-54, 2008.
- Zumsteg A, Christofori G. Corrupt policemen: inflammatory cells promote tumor angiogenesis. **Curr Opin Oncol.**, 21(1):60-70, 2009.

Anexos

Declaração de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

DECLARAÇÃO

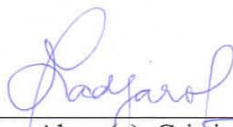
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada **“Atividade Antitumoral, Antiinflamatória e Antiulcerogênica de duas variedades de própolis brasileira”**.

(X) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1612-1; 1613-1; 1614-1; 1616-1; 1617-1; 1618-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno(a): Cristiana Madjarof



Orientador(a): Dr. João Ernesto de Carvalho

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEa/IB - UNICAMP



CEEAA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEAA/Unicamp**

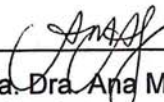
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1612-1**, sobre "**Atividade anti-inflamatória dos extratos brutos de duas variedades de própolis brasileira em modelo de edema de pata induzido por carragenina**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Cristiana Mardjarof**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEAA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

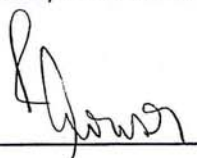
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1612-1**, entitled "**Antiinflammatory activity of crude extract of two types of brazilian propolis in carrageenan-induced rat paw edema model**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guarnido
Presidente



Fátima Afonso
Secretária Executiva



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

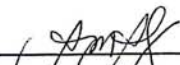
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1613-1**, sobre "**Atividade anticâncer dos extratos brutos de duas variedades de própolis brasileira em modelo de tumor sólido de Ehrlich**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Cristiana Mardjarof**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

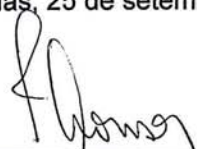
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1613-1**, entitled "**Anticancer activity of crude extract of two types of brazilian propolis in Ehrlich solid tumor model**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

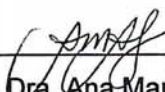
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1614-1**, sobre "**Atividade anticâncer dos extratos brutos de duas variedades de própolis brasileira em modelo de tumor ascítico de Ehrlich**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Cristiana Mardjarof**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

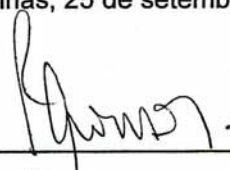
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1614-1**, entitled "**Anticancer activity of crude extract of two types of brazilian propolis in Ehrlich ascite tumor model**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana-Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

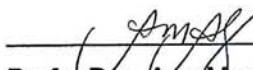
CERTIFICADO

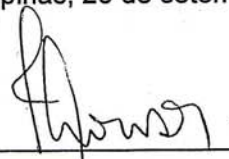
Certificamos que o Protocolo nº **1616-1**, sobre "**Atividade anti-inflamatória dos extratos brutos de duas variedades de própolis brasileira em modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Cristiana Mardjarof**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1616-1**, entitled "**Antiinflammatory activity of crude extract of two types of brazilian propolis in ear croton oil-induced oedema model**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

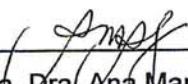
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1617-1, sobre "Atividade anti-ulcerogênica dos extratos brutos de duas variedades de própolis brasileira", sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Cristiana Mardjarof, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 15 de setembro de 2008.

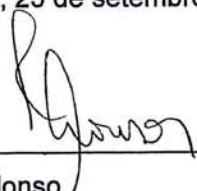
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1617-1, entitled "Antiulcer activity of crude extract of two types of brazilian propolis", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 15, 2008.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

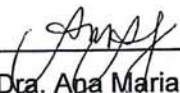
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1618-1**, sobre "**Atividade anti-secretora dos extratos brutos de duas variedades de própolis brasileira**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Cristiana Mardjarof**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

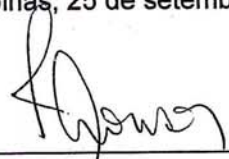
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1618-1**, entitled "**Antisecretory activity of crude extract of two types of brazilian propolis**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva