

Universidade Federal de Minas Gerais
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Faculdade de Medicina

**ESTUDO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM UM
MODELO MURINO DE ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA**

SANDRA APARECIDA LIMA DE MOURA

Belo Horizonte

Abril de 2009

SANDRA APARECIDA LIMA DE MOURA

**ESTUDO DOS EFEITOS DO EXTRATO DE PRÓPOLIS EM UM
MODELO MURINO DE ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Patologia Geral

Orientadora: Prof^a. Dra. Denise Carmona Cara Machado

Co-orientadora: Prof^a. Dra Mônica Alves Diniz Ferreira

Co-orientadora: Prof^a. Dra Silvia Passos Andrade

Belo Horizonte

Abril de 2009

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à professora Denise Carmona, minha orientadora, que sempre demonstrou acreditar no potencial de meu trabalho, pela orientação oportuna oferecida.

À professora Mônica por ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam, por ser paciente e generosa, pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Por sua amizade, principalmente pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente.

À professora Silvia Passos pela sua disponibilidade irrestrita, sua presença exigente, crítica e criativa na arguição das idéias apresentadas... creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos.

Aos membros da banca por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho.

À minha pupila Luiza; com a qual creio ter contribuído em sua iniciação científica e que hoje é meu orgulho.

Em especial às irmãs que fiz aqui; Maria Letícia, Mariazita e Luana saibam que *a saudade é o bolso onde a alma guarda aquilo que ela provou e aprovou. Aprovadas foram as experiências que tivemos.* Experiência de rir à toa, de chorar de raiva, de falar bobagens sem pudor, de olhar nos olhos umas das outras e saber exatamente o que se pensa, de comer biscoito “sujo com cocô de mariposa”. De fazer festa na casa do professor Wagner e dançar Sidney Magal, das vaquinhas para comprar o lanche da tarde, da fraternidade e lealdade mais sobre tudo, da mais pura “Alegria”. *O que valeu a pena está destinado à eternidade.* Muito obrigada!

À toda a equipe do NIPE pela maravilhosa convivência – alunos: Silvia, Ana, Solange, Belinha, Lucélia, Silvio, Adolfo, Débora, Olivia, Vanessa, professores e funcionários e a todos que me ajudaram de alguma forma. Em especial ao professor Wagner Tafuri, a quem admiro muito pelas raras qualidades inatas que possui. *Quando eu crescer quero ser como você!*

Um agradecimento especial deve ser feito à Mirna a qual por ser uma excelente técnica, que sempre nos auxiliou nos experimentos.

Às demais técnicas que forneceram condições adequadas para o desenvolvimento dos trabalhos: Vânia, Monaliza e Olinda.

Às minhas queridas amigas: Claudia e Juliana por todos os momentos divertidos que passamos juntas e pela nossa eterna amizade, ao amigo Ferdinan pela sua doçura e por estar sempre disposto a ajudar e ser um amigo para todas as horas.

À amiga Marta pela amizade sólida e verdadeira e à amiga Eliane pela nossa alegre e tranqüila convivência, pela energia positiva e pelo carinho.

Aos familiares que sempre me apoiaram. Aos meus pais, Sérgio e Vanir, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo, aos meus irmãos Saulo e Serginho por sempre torcerem por mim, mas especialmente à minha mãe, por suportar pacientemente uma filha distante da vida familiar durante estes anos. No entanto, é ela mesma a razão disto tudo, e, é a ela que ofereço a minha festa.

Aos apicultores que me mostraram em meio ao campo perfumado de capim gordura um velho fumando cachimbo, contemplando a chuva que caía sobre as plantas e dizendo: *“Veja como estão agradecidas!”*... *A sentir o cheiro do alecrim, hum!!!!...* *“alecrim dourado que nasceu no campo sem ser semeado”*... ensinaram-me que as plantinhas do mato curam até mau olhado e que as abelhas para fazerem o mel têm que dançar a dança do ventre...OBRIGADO!!!

E finalmente agradeço ao meu par Ricardo, por sua extensa paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios. À minha filha Clara e meu filho Bernardo por cederem parte do escasso e precioso tempo a que têm direito e que lhes costumo dedicar. Vocês são a razão da minha vida.

A Deus por ter depositado em mim as capacidades de que disponho e por ter tido a oportunidade, dentre tantos milhares de miseráveis deste país, para desenvolver meus talentos.

E do aqui vivi fica a vontade de ...

Que eu continue a acreditar no outro mesmo sabendo de alguns valores esquisitos que permeiam o mundo; que eu continue otimista, mesmo sabendo que o futuro que nos espera nem sempre é tão alegre; que eu continue com a vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, uma lição difícil de ser aprendida; que eu permaneça com a vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que com as voltas do mundo, eles vão partindo...

Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, sentir, ou entender esta ajuda; que eu exteriorize a vontade de amar, entendendo que amar não é sentimento de posse, é sentimento de doação; que eu alimente minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes tão fortes quanto o sucesso e a alegria; que eu atenda sempre mais à minha intuição, que sinaliza o que de mais autêntico possuo; que eu pratique sempre mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses; que eu manifeste o amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exige muito para manter sua harmonia; que eu acalente a vontade de ser grande, mesmo sabendo que minha parcela de contribuição no mundo é pequena; e, acima de tudo...

Que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte desta maravilhosa teia chamada vida, criada por alguém bem superior a todos nós!

Chico Xavier

Colaboradores/ Financiadores

Esse trabalho contou com os seguintes colaboradores:

Prof^a. Dra. SILVIA PASSOS ANDRADE do Laboratório de Angiogênese do ICB-UFMG.

Prof. Dr. Antonio Salatino Laboratório de Botânica do Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo (IBUSP).

Prof^a. Dra. Giuseppina Negri do Laboratório de Fisiobiologia UNIFESP- São Paulo.

Ao Sr. Ildeu Batista de Almeida, apicultor que gentilmente cedeu o pasto apícola, doou as abelhas, colméias e a própolis.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Coodenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

A própolis é um produto resinoso quimicamente complexo que as abelhas produzem a partir de exsudatos e brotos de plantas. Suas atividades biológicas já catalogadas (efeitos anti-tumorais, anti-inflamatórios e anti-angiogênicos) são heterogêneos e variam de acordo com o tipo de extrato e a composição química da própolis. Nesse trabalho foram caracterizados quimicamente os principais componentes do extrato aquoso da própolis verde do município de Jaguaraçu (Minas Gerais-Brasil) para que fossem avaliados os efeitos deste extrato na angiogênese inflamatória no modelo murino de implante de esponjas. A análise química realizada por HPLC/MS/MS revelou como principais compostos os ácidos mono e di-O-cafeoilquínicos; fenilpropanoides, assim como artepilina C e drupanin sendo esses últimos detectados em menores quantidades no extrato aquoso. Camundongos Swiss fêmeas foram implantados subcutaneamente com discos de esponja de poliéster-poliuretano para induzir os eventos inflamatórios e angiogênicos da cicatrização. Os animais receberam por via oral (500 mg/kg) de extrato aquoso de própolis verde. A formação dos vasos sanguíneos foi avaliada pelo conteúdo de hemoglobina e pela análise morfométrica do número de vasos nos implantes. Ambos os parâmetros foram significativamente reduzidos no grupo tratado em relação ao grupo controle. Os níveis de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumentaram progressivamente no grupo tratado, mas diminuíram após o dia 10^o dia no grupo controle. A análise histológica da matriz esponjosa revelou um aumento progressivo no influxo celular e da deposição de colágeno em ambos os grupos ao longo de todo o período experimental, entretanto, no grupo tratado, nos dias 4 e 7, o processo inflamatório foi reduzido em comparação ao grupo controle. O acúmulo de neutrófilos e macrófagos foi determinado pela medição das atividades da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil-β-d-glucosaminidase (NAG) respectivamente, e a atividade dos neutrófilos não foram afetadas pela própolis, mas a atividade de NAG foi reduzida pelo tratamento no 14^o dia. Os níveis de TGF-β1 aumentaram progressivamente em ambos os grupos, sendo maior (40%) no 14^o dia nos implantes do grupo controle. Os níveis da citocina pró-inflamatória TNF-α apresentaram um pico no 7^o dia no grupo controle, e no 14^o dia no grupo tratado com própolis. Nossos resultados indicam que os efeitos antiinflamatório/anti-angiogênico da própolis estão associados com a modulação da expressão dessas citocinas, e que os fatores-chave do processo de cicatrização podem ser modulados por seus constituintes.

ABSTRACT

Propolis is a chemically complex resinous bee product which has gained worldwide popularity as a means to improve health condition and prevent diseases. The main constituents of an aqueous extract of a sample of green propolis from Southeast Brazil were shown by HPLC/MS/MS to be mono- and di-O-caffeoylquinic acids; phenylpropanoids known as important constituents of alcohol extracts of green propolis, such as artepillin C and drupanin were also detected in low amounts in the aqueous extract. The anti-inflammatory activity of this extract was evaluated by determination of wound healing parameters. Female Swiss mice were implanted subcutaneously with polyester-polyurethane sponge discs to induce wound healing responses, and administered orally with water extract of green propolis (500 mg/kg). The effects on various components of inflammatory angiogenesis (cell recruitment, blood vessel formation and extracellular matrix deposition) were evaluated at 4, 7 and 14 days post-implantation. Blood vessel formation as assessed by hemoglobin content and by morphometric analysis of the implants was reduced by WEP compared to the untreated group. The levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) increased progressively in the treated group but decreased after day 10 in the control group. Accumulation of neutrophils and macrophages was determined by measuring myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) activities, respectively. The fibrovascular stroma and deposition of extracellular matrix were evaluated by histopathologic and morphometric analyses. In the propolis-treated group at days 4 and 7 the inflammatory process in the sponge was reduced in comparison with control. Neutrophil accumulation was unaffected by propolis, but NAG activity was reduced by the treatment at day 14. The levels TGF- β 1 intraimplant increased progressively in both groups but was higher (40%) at day 14 in the control implants. The pro-inflammatory levels of TNF- α peaked at day 7 in the control implants, and at day 14 in the propolis-treated group. A progressive increase in cell influx and collagen deposition was observed in control and propolis-treated groups during the whole period. However, these effects were attenuated in the propolis-treated group at days 4 and 7, indicating that key factors of the wound healing process are modulated by propolis constituents. Our results indicate that the anti-inflammatory/anti-angiogenic effects of propolis are associated with cytokine modulation.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Curva padrão de flavonóides	49
GRÁFICO 2	Peso úmido (A) e área fibrovascular (B) dos implantes dos grupos controle e tratado com própolis.	58
GRÁFICO 2A	Peso úmido dos implantes dos grupos controle e tratado com própolis.	58
GRÁFICO 2B	Área fibrovascular dos implantes dos grupos controle e tratado com própolis.	58
GRÁFICO 3	Avaliação da inflamação pelas atividades da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) nos implantes de esponja.	60
GRÁFICO 3A	Avaliação da inflamação pela atividade da mieloperoxidase (MPO)) nos implantes de esponja .	60
GRÁFICO 3B	Avaliação da inflamação pela atividade N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) nos implantes de esponja.	60
GRÁFICO 4	Perfil da angiogênese nos implantes de esponja em camundongos controle e tratado com extrato aquoso de própolis.	62
GRÁFICO 4A	Concentração de Hb nos implantes de esponja	62
GRÁFICO 4B	Análise morfométrica do numero de vasos por 15 campos nos implantes de esponja.	62
GRÁFICO 4C	Níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) nos implantes de esponja.	62
GRÁFICO 5	Níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e do fator de crescimento transformante beta (TGF- β 1) nos implantes de esponja.	65
GRÁFICO 5A	Níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) nos implantes de esponja.	65

GRÁFICO 5B	Níveis do fator de crescimento transformante beta (TGF- β 1) nos implantes de esponja.	65
GRÁFICO 6	Análise morfométrica da deposição de colágeno no implantes de esponja.	67
GRÁFICO 6A	Análise morfométrica da deposição do colágeno tipo III (colágeno fino) no implantes de esponja.	67
GRÁFICO 6B	Análise morfométrica da deposição do colágeno tipo I (colágeno denso) no implantes de esponja.	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Seqüência da obtenção do extrato aquoso da própolis verde	38
FIGURA 2	Esponja antes e após ser implantada e seu posicionamento na região subcutânea dorsal dos animais.	42
FIGURA 3	Momento do pouso e coleta de abelha <i>Apis mellifera</i> (africanizada) sobre ápices vegetativos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> .	47
FIGURA 4	Fotomicrografias dos cortes histológicos (5 µm, HE) representativos dos implantes de esponja dos grupos controle e tratado com própolis durante 4 (A e B), 7 (C e D) e 14 dias (E e F) respectivamente.	55
FIGURA 5	Fotomicrografias dos cortes histológicos representativos dos implantes de esponja corados em (Picrosirius-red, 5µm) para avaliação do colágeno.	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Características organolépticas das amostras de própolis coletadas no Município de Jaguaraçu.	48
TABELA 2	Absorbância das diferentes concentrações de flavonóides das amostras para determinação da curva padrão.	49
TABELA 3	Concentração de flavonóides nos vários tipos de solventes usados nas extrações da própolis.	50
TABELA 4	Dados cromatográficos e espectrométricos dos constituintes presentes no extrato aquoso da própolis verde de Minas Gerais (Sul do Brasil) obtidos por HPLC/ESI/MS (high pressure liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectroscopy).	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ALCL ₃	Cloreto de Alumínio
bFGF	Fator básico de crescimento fibroblástico
CAPE	Éster de ácido caféico
CPI	Coletor de própolis inteligente
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEBIO	Centro de Bioterismo
DAB	Diaminobenzidina
DAD	Detector de arranjos Diiodo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	<i>Ethilene diamine tetraacetic acid</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESI	Eletrospray-ionizante
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
<i>g</i>	Giros
GL	Graus Gay-Lussac
Hb	Hemoglobina
HE	Hematoxilina-Eosina
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HPLC	High performance liquid chromatography
HOAc	Ácido acético
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetil-amonio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HIF	Fator de Hipóxia tecidual
IL-1	Interleucina-1
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
Kg	Quilograma
MeOH	Metanol

MPO	Mieloperoxidase
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NACL	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ PO ₄	Fosfato de sódio
nm	Nanômetros
NAG	N-acetil- β -D-glicosaminidase
NIPE	Laboratório de Neuro-Imuno-Patologia-Experimental
OD	Densidade ótica
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampão salina fosfato)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaqueta
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
TGF- β 1	Fator de Crescimento Transformante beta-1
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
°C	Graus Celsius
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Própolis	17
1.1.1	<i>Histórico</i>	17
1.1.2	<i>Própolis: importância, perspectivas e indicadores da origem botânica.</i>	18
1.1.3	<i>Composição química</i>	21
1.1.4	<i>Atividades antiinflamatória, cicatrizante e anti-angiogênica da própolis</i>	23
1.2	O processo de reparo	25
1.2.1	<i>A cascata da cicatrização</i>	26
1.2.2	<i>A influência da inflamação no reparo tecidual</i>	29
1.2.3	<i>A angiogênese inflamatória</i>	30
1.3	Modelo de implantação subcutânea de discos de esponja na indução da angiogênese inflamatória	32
2.	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Apiários	35
3.2	Procedimento de coleta da própolis	35
3.3	Caracterização organoléptica da própolis	35
3.4	Avaliação da presença de flavonóides nos diferentes extratos	36
3.5	Determinação da curva padrão de flavonóides	37
3.6	Preparo dos extratos de própolis	37
3.7	Análise da composição química dos extratos de própolis usando HPLC/DAD/ESI/MS	39
3.8	Animais	40
3.9	Implante dos discos de esponja	42
3.10	Avaliação histológica dos implantes de esponja	43
3.11	Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO)	43

3.12	Dosagem da atividade da N-acetil- β -d-glicosaminidase (NAG)	44
3.13	Quantificação de hemoglobina (Hb) para avaliação da angiogênese	45
3.14	Avaliação da cinética de citocina TNF- α , VEGF e TGF- β 1 produzidas no modelo de implante de esponja	45
3.15	Análise estatística	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Caracterização organoléptica da própolis de Jaguaraçú	47
4.2	Análise do teor de flavonóides em função do solvente	49
4.3	Análises químicas	51
4.4	Caracterização da angiogênese inflamatória	54
4.5	Avaliação histológica da angiogênese inflamatória	54
4.6	Infiltrado inflamatório	57
4.7	Avaliação da inflamação nos implantes de esponja	59
4.8	Avaliação da angiogênese nos implantes de esponja	61
4.9	Avaliação das citocinas TNF- α e TGF- β 1 nos implantes	64
4.10	Formação da matriz extracelular e deposição de colágeno	66
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	75
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
8	ANEXOS	92
	ANEXO 1	92
	ANEXO 2	97
	ANEXO 3	98
	ANEXO 4	99
	ANEXO 5	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. Própolis

1.1.1. Histórico

Ao longo da história, o homem apreendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Das várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas (ex. ervas) além das tradicionais preparações galênicas (ex. extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, a qual é administrada sob diversas formas (Pereira et al., 2002).

A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colméia (Marcucci, 1996; Burdock, 1998). As abelhas de fato usam esta substância para protegê-las contra insetos e microorganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colméia (isolamento térmico e contra inimigos), no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores. Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação (Marcucci, 1996), já que à própolis é também atribuída ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver (Park et al., 1998).

A própolis é conhecida e utilizada pelo homem desde os tempos mais remotos. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No primeiro texto médico conhecido por "Livro de produção de Medicamentos para todas as partes do Corpo Humano", narrado no papiro de Ebers e escrito há cerca de 1.700 a.C., se faz menção à própolis como produto medicinal (Apicultura, 2004). No antigo Egito era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos ("cera negra") (Pereira et al., 2002).

Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores, enquanto a elite feminina da época utilizava esta multi-droga no alívio da síndrome pré-menstrual e de cólicas. Para médicos europeus dos séculos XVI em diante, particularmente russos e poloneses, a própolis encontrou emprego como antibacteriano, tuberculostático e agente dermatológico antieczematoso e antiacne. Na odontologia, a própolis era empregada no tratamento de abscesso e gengivas hemorrágicas,

bem como nos casos de candidíases bucais e halitoses. A própolis também é encontrada nos receituários chineses antigos como medicamento ativo contra moléstias coronárias e hipertensão (supondo-se atividade hipolipêmica) e disfunções hematológicas (Nothenberg, 1997).

O termo própolis já era descrito no século XVI na França. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, a própolis foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas. Na antiga URSS, a própolis mereceu especial atenção em medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (Pereira et al., 2002).

Em 1908, surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e "composição", indexado no *Chemical Abstracts* (referência nº 192). Em 1968 surgiu no *Chemical Abstracts* o resumo da primeira patente utilizando à própolis romena, para a produção de loções para banho (Pereira et al., 2002). Anos atrás, famosos fabricantes de violinos na Itália, incluindo *Stradivarius*, usavam a própolis como um ingrediente na composição de vernizes. Foi descrita a coloração especial de alguns violinos feitos por antigos mestres de Cremona devido ao uso de própolis nos polidores e vernizes (Marcucci, 1996; Burdock, 1998). Hoje em dia a própolis ainda é utilizada na resina de instrumentos encordados e para o reparo de acordeões (Burdock, 1998).

1.1.2. Própolis: importância, perspectivas e indicadores da origem botânica

Comercialmente, a própolis tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Sua inserção se deve, essencialmente, às inúmeras constatações das diferentes atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. Como consequência, observou-se incremento do valor agregado ao produto, sendo este um dos importantes indicadores que representam a cadeia produtiva da apicultura.

Ilustrando esta afirmação, Northenberg (1997) mencionou diferenças da ordem de até 30 vezes nos valores de venda do produto já beneficiado e comercializado no Brasil e no Japão, podendo esta discrepância ser explicada pela sua grande popularidade em países da Europa Oriental e, particularmente, nos asiáticos como Japão, Coréia do Sul e China.

Segundo Pereira e colaboradores (2002) 92% de toda a própolis *in natura* consumida no Japão é de origem brasileira, o que gera faturamento em torno de US\$ 20 milhões/ano às exportações nacionais.

No panorama atual, o Brasil ocupa a posição de terceiro maior produtor mundial, perdendo apenas para a Rússia e para a China (Pereira et al., 2002).

A importância da própolis é comprovada não somente em termos econômicos, mas principalmente científicos, com centenas de artigos publicados nas últimas décadas. Todavia, segundo constatações de Pereira e colaboradores (2002), apesar da posição de destaque na produção de própolis, e de possuir a quinta maior produtividade científica no assunto, a atividade de pesquisa no Brasil não reflete, nem em número nem em conteúdo, o interesse internacional que a própolis brasileira possui, principalmente para os japoneses.

Os estudos, desenvolvidos em praticamente todo o mundo, atribuem à complexidade de sua composição, propriedades farmacológicas importantes, considerando alguns compostos isoladamente, ou o sinergismo existente entre eles. Os resultados indicam atividade de amplo espectro contra diferentes microorganismos (fungos, bactérias, vírus, protozoários etc.) de distintos graus de patogenicidade para o homem e outros animais. Ainda, importantes propriedades biológicas foram comprovadas, como a antioxidante, a citotóxica a antiinflamatória e a imunomoduladora. Tais resultados encontram-se bem documentados em revisões bibliográficas específicas, como a conduzida por Banskota et al. (2001), na qual são apresentados dados compilados desde os citados por Guisalberti (1979) até os dias atuais.

Contudo, a exemplo de muitos produtos naturais, falta à própolis garantia de parâmetros essenciais quanto à sua eficácia, segurança e qualidade, de forma a permitir o uso racional do produto. Para tanto, avaliações fitoquímicas e farmacotológicas se fazem necessárias. Embora ainda incipientes alguns trabalhos também vêm sendo desenvolvidos no intuito de se estabelecer dosagens de ingestão diária consideradas seguras (Burdock, 1998).

Ainda, deve-se considerar que a associação da origem botânica aos fatores climáticos do local de produção implicam diferenças marcantes, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo da composição química do produto final (Guisalberti et al., 1979; Jeanne, 1984; Greenaway et al., 1990; Cheng & Wong, 1996; Asis, 1991; Bankova et al., 1992; Gary, 1993; Tomás-Barberán, 1993) dificultando a obtenção de regularidade na eficácia farmacológica do produto.

Conforme discutido por Pereira et al. (2002), faz-se necessário definir quais parâmetros terapêuticos mínimos os diferentes tipos de própolis devem possuir, ou idealmente que composição química mínima deveria ser exigida para que apresentem as propriedades farmacológicas desejadas, devendo-se responder a um questionamento antigo: qual própolis serve para qual ação terapêutica?

Neste sentido, uma das etapas primordiais a serem galgadas é a identificação das espécies vegetais que estariam contribuindo como fontes potenciais de compostos bioativos constituintes da própolis. Dessa forma, o produto poderia ser considerado não só provedor de modelos de moléculas que apresentem atividades biológicas importantes, mas também como fonte de tais constituintes.

Se por um lado a definição do produto evidencia a complexidade de sua origem e composição, por outro demonstra a importância da utilização de bases científicas e aportes tecnológicos no suporte e orientação de investigações relativas à própolis. Esta afirmação justifica-se pelo caráter multidisciplinar que permeia a pesquisa de biofármacos, havendo envolvimento e complementaridade de conhecimentos advindos de diversas ciências, tais como Farmacologia, Química Orgânica, Botânica, Etnobotânica, Etnofarmacologia, Quimiosistemática, dentre outras (Di Stasi, 1996).

Vale ressaltar que, embora as plantas sejam uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, os quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos, muitas vezes, a síntese de certos compostos por vias químicas artificiais é tecnicamente inviável, seja pela dificuldade metodológica ou pelo elevado custo que apresentam.

Recentemente, vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de se identificar efetivamente a origem da própolis nos trópicos, por meio de diferentes técnicas, sejam elas (diretas) observação de coleta no campo ou (indiretas) análise de constituintes químicos e estruturas vegetais presentes.

Sem dúvida, a observação direta de abelhas no campo coletando matéria-prima para a produção de própolis seria a técnica mais adequada e cujos resultados seriam incontestáveis no intuito de gerar informações de fontes vegetais utilizadas para produção de própolis pelas abelhas.

No Brasil, o grande desafio nesta área é justamente a grande diversidade florística e a disponibilidade de espécies potencialmente atrativas para as abelhas para a coleta de própolis. De acordo com Joly (2001), o país é recordista em termos de biodiversidade,

detendo cerca de 20% das espécies do planeta. Aproximadamente 55.000 espécies de plantas estão catalogadas em território nacional, de um total estimado entre 350.000 e 500.000 espécies (Guerra & Nodari, 2001).

Banskota et al. (1998), por meio de comparações dos resultados de análises químicas efetuadas em amostras de própolis e informações da literatura de constituintes químicos presentes em diversas espécies vegetais, sugeriram que *Baccharis* spp seria uma importante fonte de própolis no Brasil, além de *Clusia minor*, *Clusia major* e *Araucária heterophylla*.

Os primeiros resultados de observações de forrageamento de própolis por *Apis mellifera* (africanizada) no Brasil foram apresentados inicialmente por Santos (1996) e em seguida por Santos & Message (1997). Os autores constataram que a coleta em *Baccharis dracunculifolia*, conhecido popularmente como “alecrim do campo”, ocorria nas gemas apicais e axilares da planta, com o auxílio das mandíbulas e do primeiro par de patas, sendo depois transferida para a corbícula e transportada para a colônia. Foi observado ainda que as abelhas coletoras são capazes de recrutar outras operárias pelo comportamento de dança.

Ao detectarem fragmentos de epiderme de um só tipo de tricomonas tectores e glandulares de *B. dracunculifolia* em amostras de própolis produzidas em áreas de cerrado de Minas Gerais, Brasil, Bastos (2001) também sugeriu grande participação dessa espécie na composição da própolis. Esse mesmo autor avaliou que a própolis verde dos locais investigados origina-se de *Baccharis dracunculifolia*, por possuir inúmeros fragmentos dessa planta em seu sedimento. Essa confirmação foi realizada por meio de estudo anatômico, utilizando microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Segundo a autora, a própolis verde, com aspecto resinoso e quebradiço, apresenta em sua análise microscópica 90 a 100% de fragmentos epidérmicos, tricomas glandulares e tectores somados e até 1% de outras fontes resiníferas.

1.1.3. Composição química

A composição exata da própolis pura varia com o tipo de solvente utilizado na extração. Em geral é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo restos orgânicos. É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes

naturais; hoje mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis. De longe, o maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, encontrados em todas as partes do reino vegetal, os quais junto com os ácidos carboxílicos modificados são componentes estratégicos na própolis, pois são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (Burdock, 1998).

Os materiais disponíveis para as abelhas coletarem a própolis são produzidos por uma enorme variedade de processos botânicos em diferentes partes das plantas. Há grande controvérsia em relação ao teor de flavonóides nas amostras brasileiras (Pereira et al., 2002). Bankova et al. (1995) concluíram que as própolis brasileiras têm uma baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos. Ainda Bankova et al. (2000) citam que em alguns casos os flavonóides são importantes componentes presentes na própolis brasileira. Marcucci et al. (2001) determinam os compostos prenilados como os maiores constituintes da própolis brasileira, e relatam que a atividade antibacteriana destes compostos pode ser aumentada com o aumento do número de resíduos prenil na molécula.

A composição heterogênea da própolis engloba enquanto grupos químicos de acordo com os seguintes autores (Walker e Crane, 1987; Greenaway et al., 1990; Marcucci, 1995; Fontana et al., 2000; Bankova et al., 2000; Pereira et al., 2002):

- a)** hidrocarbonetos superiores (penta-, hexa-, nonacosanoshexanos);
- b)** álcoois (cinâmicos, fenético, prenilico, isobutenol, benzílico);
- c)** ácidos alifáticos (acético, angélico, butírico, fumárico, isobutírico, metilbutírico) e ésteres derivados (acetatos de isobutila, isopentila e isopentelina);
- d)** ácidos aromáticos (benzóico, cafeico, cinâmico, cumáricos (-*o*, -*m*, -*p*), ferúlico, gálico, salicílico, 3-4-dimetoxicinâmico, gentísico, hidroxicinâmico, isoferúlico, vanílico) e ésteres aromáticos derivados (acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, cafeato de fenil etila, ferulato de prenila, salicilato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, cafeato de cinamila, cafeato de butila, benzoato de etila, benzoato de metila, salicilato de metila; ésteres do ácido cafeico com álcoois graxos de cadeia longa - dodecanol, tetradecanol, tetradecenol, hexadecanol);

e) ácidos graxos superiores típicos de ceras (araquídico, behênico, cerótico, lignocérico) e usuais (palmítico, oleico, láurico, mirístico) e seus ésteres (hexacosilhexadecanoato);

f) aldeídos (benzaldeído, aldeído caprótico, vanilina, isovanilina, *p*hidroxibenzaldeído);

g) cetonas (acetofenona e seus derivados);

h) flavonas e flavonóis (acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éster, crisina, galangina, galangina-3-metil éster, quercetina, canferol, tectocrisina, canferid; 3,7,4',5'tetrametil éter da quercetina);

i) flavanonas (naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-butirato, pinobanksina-3-metil éter, pinocembrina, pinostrobina);

j) chalconas e diidrochalconas (de alpinetina, naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinocembrina, pinostrobina); terpenóides (farnesol, geraniol, cimeno, limoneno, estireno, naftaleno, β -bisabolol, 1,8-cineol, derivados de clerodane, derivados do labdane, β -amirin, sesquiterpenóides, ledol, spatulenol, germacren);

m) esteróides (acetatos de estigmasterol e calinasterol);

n) aminoácidos (alanina, β -alanina, ácido α -aminobutírico, ácido- δ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, triptofano, valina, serina, treonina, tirosina);

o) açúcares (*d*-ribofuranose, *d*-frutose, *d*-glucitol, *d*-glucose, talose, sacarose e xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol, inositol);

p) lignanas (sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofuran);

q) vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E);

r) minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio, cobalto).

1.1.4. Atividades antiinflamatória, cicatrizante e anti-angiogênica da própolis

A atividade antiinflamatória da própolis já está bastante reconhecida, principalmente contra doenças do sistema muscularto-articular e outros tipos de inflamações,

infecções e reumatismos (Marcucci, 1996). Apesar do mecanismo exato de ação e dos principais compostos responsáveis ainda não terem sido estabelecidos (Rossi et al., 2002), as pesquisas têm revelado um importante papel da própolis no metabolismo do ácido araquidônico (Rossi et al., 2002). Os metabólitos do ácido araquidônico exercem uma variedade de atividades biológicas. Vários estudos têm comprovado que os metabólitos da ciclooxigenase modulam a proliferação celular, crescimento de tumores e respostas imunes, enquanto que os metabólitos da lipooxigenase podem influenciar em várias respostas biológicas incluindo quimiotaxia, secreção de hormônios, transporte de íons, estímulo de adesão de células tumorais, desenvolvimento de tumores e regulação do potencial metastático de células tumorais. Deste modo vários estudos estabelecem os metabólitos do ácido araquidônico como moduladores de patogênese de várias doenças imunológicas e inflamatórias (Rao et al., 1995). Sud'ina et al. (1993) demonstraram que o CAPE, um composto ativo nos extratos de própolis, contribui para a atividade antiinflamatória da própolis *in vivo* por inibir a lipooxigenase e por agir como um antioxidante.

Seqüencialmente Rossi et al. (2002) relataram que os extratos etanólicos de própolis inibem também a atividade da ciclooxigenase em pulmão de ratos de forma dose-dependente, além disso, entre os compostos isolados testados apenas o CAPE e a galangina tiveram efeito, sendo o primeiro mais eficaz que o segundo.

Borrelli et al. (2002) observaram que os extratos etanólicos de própolis com CAPE e o CAPE isolado inibem de forma dose-dependente o edema de pata em ratos, o volume de exsudato, a migração dos leucócitos e a artrite induzida por carragenina.

Além disso, os extratos de própolis sem CAPE e a galangina não demonstraram efeitos antiinflamatórios, sugerindo que este efeito da própolis se deve ao seu conteúdo de CAPE. Uma explicação para a maior atividade do CAPE isolado do que a própolis que o contém é que vários flavonóides que em altas concentrações são capazes de inibir a síntese de prostaglandinas, também são capazes em baixas concentrações, de estimular a enzima para a produção de prostaglandinas (Borrelli et al., 2002).

Trabalhos mais recentes, (Ghisalbert, 1979; Kayyal et al., 1993; Hu et al., 2005; Paulino et al., 2008) utilizando diferentes modelos para o estudo da inflamação demonstraram que a própolis e a artepilina C são capazes de inibir a mobilização de neutrófilos e diminuir os efeitos da oxidação causada durante a explosão respiratória. Sehn et al.,(2009) demonstraram que a própolis também foi capaz de acelerar a cicatrização por

estimulação dos queratinócitos e da proliferação celular. Temiz et al. (2008) e Kilicoglu et al., (2008) em experimentos com modelo de anastomose de cólon verificaram que nos grupos tratados com própolis a cicatrização foi mais rápida.

Além disso, foi demonstrado por Hepsen et al. (1999) que a própolis suprimiu a neovascularização da córnea em coelhos, através das vias ciclo- e lipooxygenase. Estudos *in vitro* usando células endoteliais humanas de veia umbilical têm demonstrado que o extrato de própolis atua na formação do tubo capilar por inibição da proliferação celular e migração de forma dose-dependente (Ahn et al., 2007).

Muitas outras propriedades biológicas e farmacêuticas da própolis foram relatadas, dentre inúmeras outras: propriedades imunogênicas, ação desintoxicante do fígado, atividade anti-úlcerativa *in vivo*, anticânceres em ratos, ação imunomoduladora por funcionar como adjuvante na imunização do toxóide tetânico (Marcucci, 1996), agente protetor contra radiações gama, anti-leishmaniose em hamster, inibidor da atividade da dihidrofolato redutase (Marcucci, 1995), efeito de cicatrização de feridas e reparo tissular agindo em dermatites devido aos ácidos alil-cafeicos e no tratamento da varicose crônica trófica (Fontana et al., 2004).

1.2. O processo de reparo tecidual

Danos tissulares de qualquer natureza (física, química ou biológica) desencadeiam de imediato uma série de eventos que de forma simplista se traduzem como rubor, tumor, calor e dor. Esses sinais resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias por estímulos físicos ou por sinalização química feita por estruturas das células rompidas, fragmentos dos elementos inertes dos tecidos (colágeno, elastinas e outros), proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados (Kumar et al., 2005).

Na continuidade do processo, ocorrem no tecido lesado a infiltração de células circulantes (neutrófilos e monócitos) e a migração de células das áreas adjacentes como células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. Essas últimas, em cooperação com as células locais, anteriormente ativadas, serão as protagonistas da fibroplasia (produção de colágeno pelos fibroblastos) e deposição de matriz extracelular, angiogênese (formação de novos vasos), cicatrização e reepitelização da região da ferida (Singer & Clark, 1999). Clark (2001) dividiu o reparo em três fases: (1) inflamação, (2) formação de tecido de

granulação, (3) remodelação. De acordo com Singer & Clark (1999), essas não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas. Essas células, além de suas conhecidas atividades imunes, estão intimamente envolvidas com as reações catabólicas de degradação dos tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento (Riches, 1996). Tais fatores são responsáveis pela reposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz.

1.2.1. A cascata da cicatrização

A cascata da cicatrização inicia-se imediatamente após a lesão quando as plaquetas entram em contato com o colágeno exposto. Com a agregação plaquetária, fatores de coagulação são produzidos resultando na deposição de um coágulo de fibrina no local da lesão. O coágulo de fibrina serve como uma matriz provisória e estabelece um “palco” para os acontecimentos posteriores de cicatrização (Clark, 2001). Plaquetas não somente levam a produção de fatores de coagulação necessários para controlar o sangramento e a perdas de fluidos e eletrólitos, mas também proporcionam uma cascata de sinais químicos, conhecidos como citocinas e fatores de crescimento, que iniciarão a resposta cicatricial. Os dois mais importantes sinalizadores são fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- β) (Kim et al., 1998). O PDGF inicia a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos. Além disso, ele também estimula a mitose de fibroblastos e de células musculares lisas.

O TGF- β acrescenta sinais importantes para a iniciação da cascata de cicatrização pela atração de macrófagos e estimula-os a secretar outras citocinas tais como, fator de crescimento fibroblástico (FGF), PDGF, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1). Além disso, o TGF- β promove a quimiotaxia de fibroblastos e células musculares, além de modular a expressão de colágeno e colagenase. O resultado final desses sinais redundantes é uma vigorosa resposta das células produtoras de matriz para garantir uma deposição rápida de um novo tecido conjuntivo no local da lesão durante a fase proliferativa que se segue a fase inflamatória (Kim et al., 1998).

Neutrófilos são as primeiras células a aparecerem na ferida 24 horas após a lesão. A principal função dos neutrófilos é remover corpos estranhos, bactérias, células não funcionais do hospedeiro e componentes lesados da matriz que possam estar na ferida (Hart, 2002; Sylvia, 2003).

Por volta de 48 horas após a lesão, monócitos são ativados e nos tecidos lesados tornam-se macrófagos. Esses macrófagos especializados da ferida são talvez, as mais importantes células inflamatórias em uma cicatrização normal (Diegelmann et al., 1981). Uma inibição na função dos macrófagos irá atrasar a cicatrização (Leibovich et al., 1975). Uma vez ativados esses macrófagos da ferida também irão produzir PDGF e TGF- β que atrairão ainda mais fibroblastos e células musculares lisas para o local da lesão. Esses grandes fagócitos também são responsáveis por remover células não funcionais do hospedeiro, neutrófilos repletos de bactérias, restos da matriz, corpos estranhos e quaisquer remanescentes de bactérias da ferida. A presença de macrófagos na ferida é um marcador de que a fase inflamatória está próxima do final e que a fase proliferativa está começando. Os linfócitos aparecem na lesão em uma fase mais tardia, mas não são consideradas as principais células envolvidas na cicatrização; sua função precisa no processo de cicatrização de feridas permanece obscuro (Diegelmann et al., 1981).

Com o progresso da fase proliferativa, o TGF- β liberado pelas plaquetas, macrófagos e linfócitos T torna-se um sinalizador crítico. O TGF- β é considerado um sinalizador mestre das funções dos fibroblastos (Roberts et al., 1993). TGF- β tem um efeito tridimensional na deposição da matriz extracelular (Roberts et al., 1992). Primeiro, ele aumenta a transcrição de genes para o colágeno, proteoglicanos e fibronectina aumentando desta forma a produção de proteínas da matriz. Ao mesmo tempo o TGF- β diminui a secreção de proteases responsáveis pela degradação da matriz e também estimula a produção do inibidor de proteases e do inibidor tecidual de metaloproteases (TIMP) (Hall et al., 2003).

A cicatrização avança e várias outras respostas são ativadas. O processo de epitelização é estimulado pela presença do fator de crescimento epidérmico (EGF) e do fator de crescimento transformante alfa (TGF- α) que é produzido por macrófagos ativados na ferida, plaquetas e queratinócitos (Hunt et al., 1984; Yates et al., 1991, Schultz et al., 1991). Uma vez que a ponte epitelial está concluída, enzimas são liberadas para dissolver a ligação na base da crosta, resultando na sua remoção. Devido à alta atividade metabólica no local da ferida, há uma crescente demanda de oxigênio e nutrientes. Fatores locais do

microambiente da ferida como o baixo pH, a redução da tensão de oxigênio e o aumento dos níveis de lactato, efetivamente, iniciam a liberação de fatores necessários para trazer um novo suprimento sanguíneo (Knighton et al., 1983; Lavan et al., 1990). Este processo é chamado angiogênese ou neovascularização e é estimulado pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e TGF- β . Células epidérmicas, fibroblastos, macrófagos e células endoteliais produzem estes fatores. Um interessante mecanismo de sinalização envolve a baixa tensão de oxigênio que, por sua vez, estimula a expressão de um fator nuclear de transcrição denominado “fator hipóxia-induzido” (HIF) pelas células do endotélio vascular. (Gerber, 1997). O HIF, por sua vez, se liga a seqüências específicas de DNA que regulam a expressão de VEGF o qual estimula a angiogênese. Os novos vasos entram na área do reparo e a tensão de oxigênio retorna ao nível normal, o oxigênio se liga ao HIF e bloqueia sua atividade levando ao decréscimo na síntese do VEGF.

Com o avanço da fase proliferativa, a célula predominante na ferida é o fibroblasto. Essa célula de origem mesenquimal é responsável por produzir uma nova matriz necessária para restauração estrutural e funcional do tecido lesado. Os fibroblastos aderem à matriz provisória de fibrina e iniciam a produção de colágeno (Clark, 2001). Existem mais de 23 tipos individuais de colágeno, mas o colágeno tipo I é o predominante na cicatriz da ferida cutânea (Prockop et al., 1998). Após a transcrição e processamento do RNAm do colágeno, esse se adere aos poliribossomos do retículo endoplasmático e novas cadeias de colágeno são produzidas. Durante esse processo, existe um importante passo envolvendo hidroxilação da prolina e resíduos de lisina (Peterkofsky, 1991). A molécula de colágeno inicialmente caracteriza-se por uma estrutura helicoidal tripla e cadeias nascentes sofrem uma nova alteração pelos processos de glicosilação (Blumenkrantz et al., 1984). A molécula de pró-colágeno é secretada no espaço extracelular onde é processada (Prockop et al., 1998). A hidroxiprolina no colágeno é importante devido ao fato dela dar estabilidade a sua conformação helicoidal (Zanaboni et al., 2000). Totalmente hidroxilado o colágeno possui uma alta temperatura. Quando a hidroxiprolina não está presente, quando por exemplo, o colágeno é produzido sob condições anaeróbicas ou na deficiência de vitamina C, esse tem sua estrutura alterada e pode sofrer desnaturação muito mais rapidamente em altas temperaturas (Peterkofsky, 1991, Woodruff, 1975). Finalmente o colágeno liberado no espaço extracelular sofre uma transformação posterior por clivagem do pró-colágeno N e C terminal. No espaço extracelular uma importante enzima, lisil-

oxidase, atua no colágeno formado estáveis ligações cruzadas. A medida que o colágeno se torna maduro e mais velho mais destas ligações cruzadas intramoleculares e intermoleculares são adicionadas dando ao colágeno uma maior estabilidade ao longo do tempo (Hornstra et al., 2003). O colágeno depositado inicialmente é mais fino que o colágeno de um tecido sem lesão e está orientado paralelamente à pele. Também com o passar do tempo, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais grosso é depositado e organizado paralelamente às linhas de tensão. Essas alterações são acompanhadas também por um aumento da força tensil da ferida indicando uma correlação positiva com a espessura do colágeno/orientação e força tensil.

1.2.2. A influência da inflamação no reparo tecidual

A inflamação é uma reação complexa a vários agentes, que consiste de respostas vasculares, celulares (migração e ativação de leucócitos) e reações sistêmicas. A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo (Kumar et al., 2005).

A reação inflamatória crônica difere acentuadamente da reação aguda na cicatrização de feridas. A função normal da inflamação em feridas agudas é preparar o leito da ferida para a cicatrização pela remoção de tecidos necróticos, debrís e contaminação bacteriana bem como o recrutamento e ativação de fibroblastos. Sob condições normais, a inflamação é um processo auto-limitante. Em contraste, a inflamação crônica nas feridas serve apenas para causar mais danos e promover mais inflamação. Em feridas agudas, a ativação de neutrófilos é virtualmente não existente após as primeiras 72 horas, enquanto que na ferida crônica, os neutrófilos estão presentes ao longo de todo processo de cicatrização (Simpson et al., 1972; Leibovich et al., 1975).

Durante todo o processo de reparo, as células inflamatórias são claramente um abundante componente ativo da resposta cicatricial, mas por que elas são essenciais se em alguns casos seus efeitos deletérios superam seus efeitos bons?

A mais recente série de estudos utilizando animais “knockout” e outras abordagens tem permitido testes mais precisos da função de cada uma das linhagens de células inflamatórias no local da ferida. Esses experimentos têm mostrado várias surpresas e abriu a porta a novas terapias para melhorar a inflamação e promover a cicatrização. Eles demonstram que algumas linhagens de células não são absolutamente necessárias para

dirigir o reparo, e, quando alguma delas está ausente, as feridas podem fechar mais rapidamente e com menos cicatriz (Martin et al., 2005).

Em contraste com o reparo tecidual em adultos, feridas cutâneas de fetos entre o segundo e o terceiro trimestre sofrem reparo sem deixar cicatriz, além de reparar os folículos pilosos e demais anexos sem que haja excessiva e desorganizada deposição de colágeno. É importante ressaltar que, este fenômeno de reparo cicatricial sem marcas, somente ocorre na ausência de resposta inflamatória. Embora o exato mecanismo pelo qual a inflamação promove a cicatrização nesse modelo não seja conhecido, é evidente que a partir dos estudos realizados em fetos e adultos que a fase inflamatória dirige a produção do tecido cicatricial e que esta, influencia na qualidade da nova pele produzida na área da ferida (Wilgus et al., 2003).

1.2.3. A angiogênese inflamatória

A angiogênese é um componente vital para o reparo dos tecidos. O controle preciso da formação de novos vasos sanguíneos durante o reparo não está claramente entendido. Sabe-se que a angiogênese é um processo complexo que envolve intensa intercomunicação entre células, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (Liekens et al., 2001)

Para que a angiogênese se inicie é necessária a presença de estímulos que podem ser lesões teciduais, hipóxia, alterações isquêmicas ou liberação de citocinas e de fatores de crescimento. A ativação de células endoteliais originadas de vasos sanguíneos pré-existentes consiste na primeira etapa do processo angiogênico. Essas células ativadas liberam enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal adjacente (Mignatti & Rifkin, 1996). A seguir, as células endoteliais “livres” iniciam a migração em direção à matriz extracelular degradada.

A etapa seguinte consiste na proliferação das células endoteliais e formação do broto capilar, que será estimulado por uma variedade de fatores de crescimento, alguns dos quais foram liberados pela própria degradação da matriz extracelular (Pettersson et al., 2000; Liekens et al., 2001; Dvorak et al., 2003; Dvorak, 2005).

A fase final do processo angiogênico inclui a formação das “alças” capilares e a determinação da polaridade das células endoteliais, que será importante para a formação do lúmen capilar e para as interações célula-célula e célula-matriz (Bischoff, 1997). A estabilização do vaso sanguíneo neoformado é atingida após a migração de células

mesenquimais ao redor dos neovasos, e sua posterior diferenciação em pericitos ou células musculares lisas (Hirsch & D'Amore, 1997). As células periendothelias são essenciais para o amadurecimento dos vasos, pois estabilizam os vasos, estimulando a produção de matriz e protegem os vasos contra a regressão (Carmeliet, 2000; Veale & Fearon, 2006).

O crescimento de novos vasos sanguíneos é fundamental para a inflamação e se associa a alterações ultra estruturais, incluindo a ativação e proliferação das células endoteliais e o remodelamento dos capilares e vênulas, o que resulta em expansão da rede da microvasculatura do tecido (Majno, 1998; Bagli et al., 2004). Uma consequência funcional dessa expansão é a promoção da inflamação através de vários mecanismos correlacionados. Primeiro, o influxo de células inflamatórias deve aumentar, segundo, deve haver um aumento do suprimento de nutrientes que irá alimentar o processo imune metabolicamente ativo, e terceiro o endotélio ativado contribui para a produção local de citocinas, quimiocinas e metaloproteases (Szekanec & Koch, 2004). Por isso a expansão anatômica da rede microvascular combinada com essa ativação funcional pode continuar recrutando células inflamatórias. A angiogênese e a inflamação devem se tornar processos cronicamente co-dependentes (Bagli et al., 2004; Szekanec & Koch, 2004; Campos et al., 2006).

A angiogênese é um processo de suma importância em várias condições fisiológicas e patológicas. Durante processos fisiológicos, como, por exemplo, o desenvolvimento embrionário (ex. vascularização do cérebro e do rim), o ciclo reprodutivo feminino (ex. proliferação endometrial, desenvolvimento do folículo ovariano e formação da rede capilar placentária) e processos reparativos (ex. cicatrização de feridas), os neovasos contribuem para o suprimento de oxigênio e de nutrientes, bem como para remoção de produtos de excreção (Nissen et al., 1998; Ribatti et al., 2001).

Paralelamente, um grande número de diferentes processos patológicos está associado à formação de novos vasos sanguíneos (Folkman, 1995). O crescimento excessivo e persistente de neovasos é característico de várias condições patológicas categorizadas como “doenças angiogênicas” (Folkman & Klagsbrum, 1987) e, nesse caso, está geralmente associado à continuidade e à cronicidade de tais enfermidades. Dentre estas se incluem artrite reumatóide (Szekanecz et al., 1998), tumores sólidos, tumores hematológicos, psoríase (Creamer et al., 1997; Konstantinova et al., 1996), retinopatia diabética e aterosclerose (Ruderman et al., 1992).

Prevenir ou reverter a angiogênese é uma abordagem que promete ajudar no combate ao câncer (Bergens & Benjamin, 2003) e doenças inflamatórias, pois a angiogênese é um componente crítico dessas doenças, e induzir a angiogênese através da administração de fatores angiogênicos exógenos é uma terapia em potencial para o reparo de tecidos isquêmicos ou lesados. (Benjamin, 2000; Keshet, 2003).

1.3. Modelo de implantação subcutânea de discos de esponja na indução da angiogênese inflamatória

A implantação de matrizes sintéticas induz uma reação inflamatória, do tipo corpo estranho, com conseqüente formação de tecido de granulação rico em novos vasos sanguíneos, representando um sistema que tem sido apropriado para o estudo da angiogênese inflamatória.

O modelo de implantação subcutânea de matrizes esponjosas em animais foi descrito inicialmente por Grindlay & Waugh (1951) e modificado por Andrade et al., em 1987. Assim, processos naturais como a vascularização de feridas na cicatrização podem ser mimetizados utilizando-se esse modelo. Outros fatores como desnutrição, doenças inflamatórias sistêmicas diabetes e tumores já mostraram afetar o processo de reparo neste e em outros modelos (Andrade et al., 1987; Teixeira et al., 1999; Brashaw et al., 2001; Ferreira et al., 2004; Belo et al., 2005; Campos et al., 2006).

Além disso, o modelo permite o estudo temporal do infiltrado inflamatório, a análise bioquímica dos fluidos coletados, os efeitos de drogas sobre o processo, além de estudos histológicos e morfométricos (Andrade et al., 1987; Bailey, 1988; Barcelos et al., 2004). Utilizando-se essa abordagem metodológica, tem sido possível caracterizar vários componentes envolvidos na neoformação vascular bem como sua associação com eventos inflamatórios (recrutamento e ativação de leucócitos).

A avaliação do desenvolvimento de estruturas vasculares na esponja pode ser feita a partir da estimativa do desenvolvimento do fluxo sanguíneo utilizando-se marcador radioativo (Andrade et al., 1987) ou fluorescente (Andrade et al., 1987) ou a partir da dosagem do conteúdo de hemoglobina (índice indireto de vascularização) (Plunkett & Hailey et al., 1990). A análise histológica associada a estudos imunohistoquímicos e morfométricos apresenta-se também, como aliada importante para a avaliação da angiogênese.

Embora existam trabalhos que evidenciam que os extratos de própolis possuem substâncias capazes de atuar inibindo a resposta inflamatória, seu exato mecanismo antiinflamatório até agora é obscuro, necessitando de estudos mais consistentes. Assim de posse das informações acima relacionadas, pretende-se nesta proposta de trabalho empregar o extrato aquoso da própolis verde de Minas Gerais, para o estudo dos seus efeitos nos fenômenos inflamatórios e angiogênicos usando o modelo de implante subcutâneo de esponja.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Caracterizar quimicamente os componentes dos extratos etanólico e aquoso da própolis verde e avaliar os efeitos do extrato aquoso na inflamação e angiogênese induzidas por implante de esponja em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterização organoléptica e química da própolis de Jaguaráçú, MG;
- ✓ Avaliar o componente inflamatório (neutrófilos e macrófagos) do tecido conjuntivo fibrovascular induzido por implante de esponjas e sua modulação pela própolis.
- ✓ Caracterizar através de parâmetros bioquímicos e histomorfométricos, a cinética da angiogênese e sua modulação pela própolis.
- ✓ Avaliar o efeito desse composto na produção de citocinas pró-inflamatória e pró-fibrogênica no implante de esponja bem como o efeito da própolis nos níveis destas citocinas.
- ✓ Avaliar o efeito da própolis no processo de reparo (deposição intra-implante de colágeno).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. APIÁRIOS

Para o desenvolvimento da pesquisa foi instalado um apiário no município de Jaguaraçu, região leste de Minas Gerais. A escolha de tal local baseou-se nas características distintas da própolis ali produzida, fato que se adequa aos interesses propostos nos objetivos específicos deste trabalho de pesquisa.

No apiário foram instalados 3 enxames de *Apis mellifera* (africanizada). Para estimular a produção de própolis pelas colônias, foram confeccionadas melgueiras especiais com abertura de 3 cm de largura, denominado coletor de própolis inteligente, ao longo das duas laterais (CPI).

3.2. PROCEDIMENTO DE COLETA DA PRÓPOLIS

Trinta dias após a instalação dos apiários experimentais, foram feitas as raspagens de todas as colônias. A própolis coletada foi desprezada, com o objetivo de isentar a primeira amostragem de qualquer contaminação eventualmente existente, advinda dos locais de onde os enxames foram transferidos.

Durante doze meses consecutivos (setembro de 2005 a setembro de 2006), foi coletada, mensalmente, toda própolis produzida pelas 3 colônias no apiário. Características organolépticas das amostras (cor, maleabilidade e odor) foram anotadas em fichas de campo.

Após a coleta, a própolis bruta foi triturada, homogeneizada e acondicionada em ambiente controlado com temperatura de -18° C.

3.3. CARACTERIZAÇÃO ORGANOLÉPTICA DA PROPOLIS

Foi feito o acompanhamento do comportamento de coleta, desde a chegada do inseto à planta, até o vôo para a colônia, registrando-se fotograficamente o processo de coleta.

O material vegetal assim coletado, correspondendo a fragmentos vegetais aderidos às diferentes partes do corpo da abelha e o que restava dos ápices coletados, foi observado e fotografado em lupa (leica MZ6).

3.4. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE FLAVONÓIDES NOS DIFERENTES EXTRATOS DA PRÓPOLIS

Esta análise tem por finalidade determinar o padrão de qualidade da própolis, de acordo com os diferentes solventes utilizados e seguindo as especificações feitas pelo Ministério da Agricultura do Brasil.

Com o objetivo de pesquisar a atividade biológica dos demais compostos presentes na própolis foi escolhido para a realização desse trabalho, o extrato que apresentou a menor concentração de flavonóides.

A determinação do teor de flavonóides foi feita pela leitura em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 5% em metanol. O cátion alumínio forma complexos estáveis com flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Nessas condições, o complexo flavonóide-alumínio absorve em comprimento de onda bem maior do que os flavonóides sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (Marcucci et al., 1998).

Para a determinação da concentração de flavonóides nas amostras, foi utilizado 1 mL do sobrenadante que foi separado, sendo este diluído 25 vezes, para que os valores encontrados se enquadrassem na curva padrão, não ultrapassando a faixa da linearidade. Deste sobrenadante diluído foram recolhidos 2 mL, que foram misturados a 1 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%, sendo o volume completado para 50 mL com metanol. Essa preparação ficou por 30 minutos em ambiente escuro para estabilização do complexo, e logo após foi medida a absorbância a 425 nm. Para o branco foi utilizado 1 mL da solução de cloreto de alumínio a 5% e o volume completado para 50 mL com metanol, a fim de evitar qualquer interferência na absorbância. Com a utilização da curva padrão pôde-se determinar a concentração de flavonóides presentes nas amostras de própolis.

3.5. DETERMINAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE FLAVONÓIDES

Foram preparadas soluções metanólicas de quercetina nas concentrações de 4,0-12,0 µg/mL, para comparação. Para cada 2 mL da solução de referência, foram adicionados 20 mL de metanol, 1 mL de solução de Cloreto de Alumínio a 5% e completado o volume para 50 mL com metanol a 20°C. Após 30 minutos em ambiente escuro, foi medida a absorvância por análise espectrofotométrica a 425 nm. Através dessa absorvância pôde-se determinar a curva padrão para a dosagem de flavonóides (Woisky & Salatino, 1998).

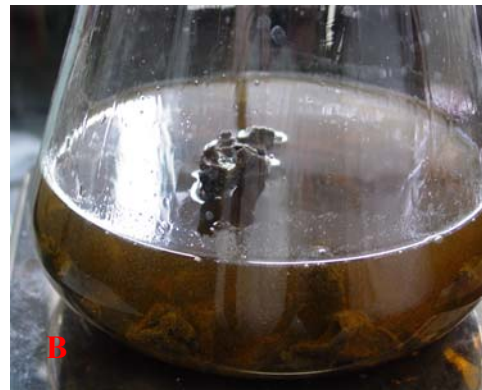
3.6. PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

Como demonstrado na Figura 1, foram trituradas 200g da amostra de própolis, em seguida foram acrescentados 500mL de água destilada. A solução formada foi mantida por um período de 30 a 60 minutos a uma temperatura de 70°C sob agitação até a completa incorporação da própolis. O material foi filtrado em papel whatman #1 para obtenção da primeira fração do extrato e resíduo. O resíduo recebeu o mesmo tratamento obtendo assim a segunda fração do extrato. As duas frações do extrato foram misturadas e posteriormente liofilizadas (FIG. 1A-F). Repetiu-se o mesmo procedimento para os demais solventes (etanol, clorofórmio, metanol, éter e acetona) (Park, et al., 1998).



A

Própolis bruta



B

Própolis bruta em solução aquosa



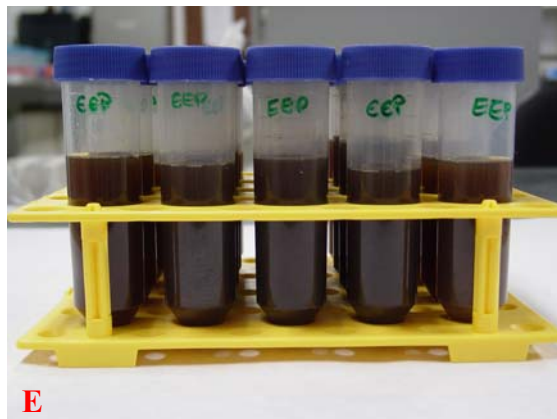
C

Aquecimento e agitação



D

Filtragem do extrato



E

Alíquotas para liofilização

FIGURA 1- Sequência da obtenção do extrato aquoso da própolis verde

3.7. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS USANDO HPLC/DAD/ESI/MS

A partir do estudo do teor de flavonóides realizados elegeu-se o extrato aquoso da própolis verde para o estudo dos principais compostos químicos presentes.

O extrato liofilizado foi tratado com MeOH:H₂O (1:1, v/v) na concentração de 10 mg/mL e filtradas através de um filtro de 0.45 µm (German Sciences, Tokyo, Japan).

A solução (10 µL) foi injetada em um sistema DAD SPD-M10AVP SHIMADZU HPLC (high pressure liquid chromatography) acoplado a um sistema de espectrofotômetro de massas (ESQUIRE 3000 PLUS, BRUKER DALTONICS) através de uma fonte eletrospray ionizante (ESI). Dados do espectro UV de todos os picos são acumulados na faixa de 240-400 nm e cromatogramas são registrados em 270 e 340 nm para compostos fenólicos. O instrumento foi controlado por um computador utilizando o programa SCL-10A VP. A fase móvel consistiu de um eluente A (0.1% aq. HOAc) e um eluente B (MeOH) utilizando a fase reversa C18 Zorbax-5B-RP-18 column (4.6 × 250 mm, 5 µm) (Hewlett Packard).

Um gradiente linear de 20–90% de B (v/v) na mistura A/B foi utilizada para as análises, de acordo com o seguinte gradiente 0 min, 20%; 10 min 30%; 20 min, 50%; 30 min, 70%; 40 min, 90%; 45 min, 40%; 50 min, retornando a condição inicial (20%) para reequilibrar a coluna antes de uma nova corrida. A vazão foi constante em 0.5 mL/min e a temperatura da coluna foi de 28°C. As condições de ionização foram ajustadas da seguinte forma: a ionização eletro spray foi obtida utilizando-se uma fonte com voltagem de – 40 V e uma compensação de tensão capilar de 4500 V. A nebulização foi feita em uma coluna coaxial de gás nitrogênio a uma pressão de 27 psi. Dessolvatação iônica feita utilizando um contador de fluxo de nitrogênio fixado em um fluxo de 7.0 L/min e a temperatura capilar foi de 325°C. Os parâmetros de fluxo do LC/MS foram de 100 µL/min. ESI/MS dados foram obtidos por meio de íons positivos e negativos. A verificação completa das massas adquiridas foi realizada por varredura de m/z 100 to 900. A fragmentação-choque dos experimentos foi realizada utilizando um dispositivo iônico He, um gás de choque, em ciclos de coluna móvel a uma voltagem de 0.3 até 2 V.

As análises foram realizadas em parceria com a Universidade Federal de São Paulo no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica

3.8. ANIMAIS

Foram utilizados para este estudo, 90 camundongos SWISS, fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, pesando entre 35 e 40 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Esses animais foram mantidos no biotério do Departamento de Patologia – ICB e alimentados com ração padrão e água *ad libitum*. Os animais foram separados aleatoriamente (n=10) e distribuídos nos seguintes grupos após o implante de disco de esponja:

A eutanásia foi realizada através de deslocamento cervical em animais anestesiados conforme estabelecido pelo CETEA (Comitê de ética animal) registrado no protocolo de aprovação número 161/05 (ANEXO 2).

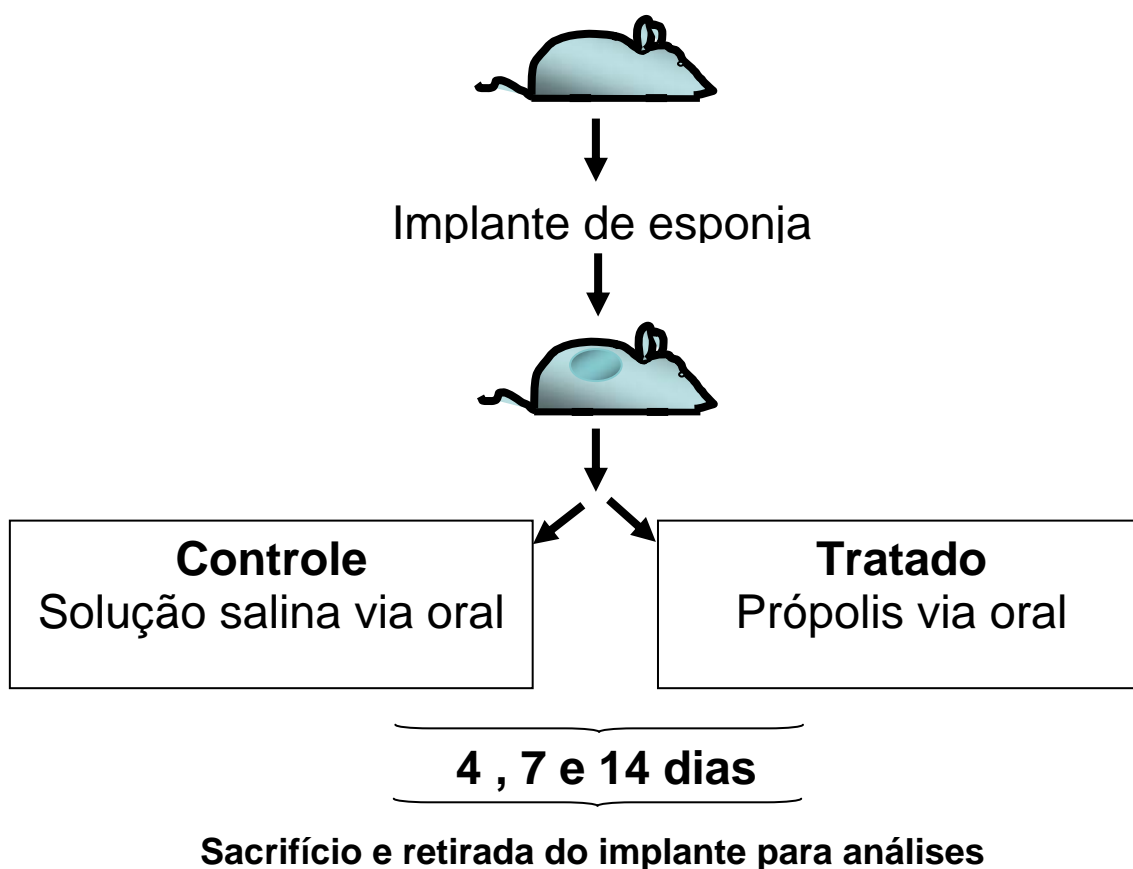
- ✚ **Controle** - os animais receberam por via oral 200µL de solução salina diariamente.
- ✚ **Tratados** - os animais receberam diariamente por via oral 200µL de extrato aquoso de própolis na dose de 500mg/kg.

Os tempos avaliados foram 4, 7 e 14 dias pós-implantação.

O Esquema 1 mostra a distribuição dos grupos.

ESQUEMA 1. Experimentos para o estudo dos efeitos do extrato aquoso administrado por via oral

TEMPOS AVALIADOS APÓS O IMPLANTE DO DISCO DE ESPONJA 4, 7 e 14 DIAS	
GRUPOS	Grupo controle: Animais tratados por via oral com solução salina estéril a 0,9%
EXPERIMENTAIS	Grupo tratado: Animais receberam 200 μ L de extrato aquoso de própolis por via oral (dose de 500mg/Kg)



3.9. IMPLANTE DOS DISCOS DE ESPONJA

Discos de esponjas de poliéster-poliuretano medindo 8,4 mm de diâmetro, 5 mm de espessura, e 4,64 mg de peso (Vitaform, Manchester UK), foram preparados e colocados em álcool 70°GL por até 4 dias. No dia do implante, as esponjas foram lavadas e fervidas a 95 °C em água destilada por 20 minutos.

Os animais foram anestesiados, a região dorsal tricotomizada, e a assepsia foi feita com álcool 70°GL. Foi realizada uma incisão com cerca de 1 cm de comprimento na pele da região dorso-lombar. O tecido subcutâneo foi divulsionado e o implante inserido a 2 cm acima da região de incisão, conforme apresentado na (FIG. 2A-B). Os animais foram colocados em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração.

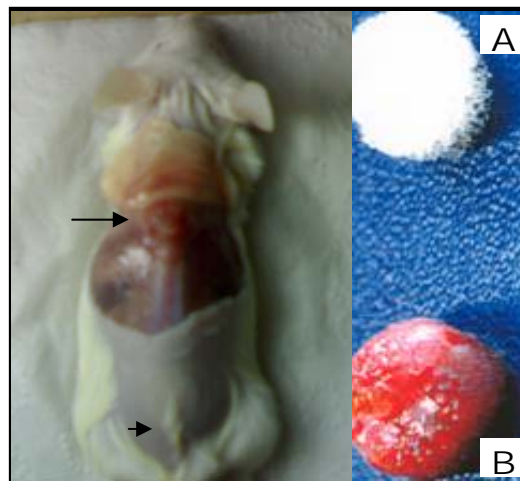


FIGURA 2- Esponja antes e após ser implantada e seu posicionamento na região subcutânea dorsal dos animais. Disco de esponja antes da implantação (A); Disco de esponja com 14 dias pós-implante com presença de tecido fibrovascular (B). Implante inserido no tecido (setas grande) e incisão cirúrgica já cicatrizada do local da inserção (seta pequena).

3.10. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS IMPLANTES DE ESPONJA

A avaliação histológica foi realizada nos tempos de 4, 7, 14 dias pós-implante nos grupos tratados e controle. Os tecidos coletados para avaliação histológica foram fixados em solução formol-salina a 10% durante 48 horas e posteriormente, processadas para inclusão em parafina. Após estes procedimentos os blocos foram cortados a 5 μ m e corados com hematoxilina-eosina (HE).

A coloração Picro-sírius red foi utilizada para caracterização do tipo de colágeno presente na matriz, e foi analisada em microscópio de luz polarizada. Os cortes histológicos foram analisados e digitalizados por uma microcâmara JVC-TK 1270/JGB e a imagens transferidas para o analisador (Kontrom eletronis, Carls Zeiss-KS300 versão 2). O índice de vascularização do tecido e a quantidade de colágeno do tipo III e tipo I presente nos implantes foram avaliados, por meio de análises morfométricas. Para a contagem dos vasos sanguíneos, esses foram definidos como estruturas com luz e com presença ou não de hemácias.

O número mínimo de campos contados (amostra) para a determinação do número de vasos foi determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra. Em uma lâmina representativa de cada grupo experimental foi determinado o número de vasos em 50 campos (aumento de 400x). Com os dados dessas 50 amostras foram criados, através de sorteio com reposição, grupos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 amostras. A média e o desvio padrão foram calculados para cada grupo. O número mínimo representativo de campos microscópicos por tratamento foi obtido quando o aumento no número de campos não resultou em considerável redução ($\leq 5\%$) no respectivo valor do desvio padrão. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. do número total de vasos/15 campo.

A área fibrovascular e a quantidade de fibras colágenas foram feitas a partir da captura e binarização de imagens obtidas dos campos histológicos em microscópio de luz polarizada e a análise densitométrica foi realizada em todos os campos da esponja nos diferentes grupos experimentais.

3.11. DOSAGEM DA ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. A dosagem de MPO é uma técnica que tem sido usada com sucesso como um

marcador bioquímico de recrutamento de neutrófilos na lesão e permite demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (Mullane et al., 1985; Cross et al., 2003).

Após a dosagem da hemoglobina, o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio a 80 mM, pH 6,0. Transferiram-se 300 µL da amostra para um microtubo e foram acrescentados 600 µL de HTAB (Brometo de hexadeciltrimetilamônio-Sigma) a 0,75%, em tampão fosfato de sódio a 80 mM, pH 5,4, misturada, sonicada durante 10 segundos e centrifugada a 2.700g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi usado no ensaio enzimático.

O ensaio enzimático foi feito da seguinte maneira: em um microtubo foram adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 1,2mM em tampão fosfato de sódio 80 mM pH 5,4; 100 µL de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-Sigma) a 6,4 Mm diluído em DMSO (dimetilsulfóxido-Merck) e 200 µL do sobrenadante das amostras. Esses reagentes foram incubados a temperatura ambiente durante 1 minuto. Após este período, foi adicionado H₂SO₄ (ácido sulfúrico) a 4M para paralisar a reação. Transferiram-se 200 µL do produto da reação para a placa de ELISA e foi feita a leitura em espectrofotômetro a 450 nm. A atividade de MPO foi expressa em densidade óptica (OD) / mg de tecido.

3.12. DOSAGEM DA ATIVIDADE DA N-ACETIL-β-D-GLICOSAMINIDASE (NAG)

A N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem do NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração dessas células nos sítios inflamatórios (Bailey, 1988).

Após a dosagem da hemoglobina, o sedimento obtido foi pesado e solubilizado em 2,0 mL de solução de NaCl a 0,9% w/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100. Procedeu-se à centrifugação a 3000g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado para o ensaio enzimático.

Para o ensaio enzimático foram adicionados 100 µL do sobrenadante das amostras (diluído quando necessário) a placa de Elisa. Às amostras foram adicionados 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina) (Sigma) a 2,24 mM diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,5 (200 mL de ácido cítrico a 0,1M; 310 mL de Na₂HPO₄ a 0,1M). Sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 60 minutos. Para paralisar a

reação foram adicionado 100 μ L de tampão glicina pH 10,6 (misturados volumes iguais de glicina a 0,8M; NaCl a 0,8M e NaOH a 0,8M) em cada poço. A absorvância foi medida por espectrofotometria em leitor ELISA a 400nm. Os resultados foram expressos como atividade NAG em densidade óptica (OD)/mg tecido.

3.13. QUANTIFICAÇÃO DE HEMOGLOGINA (Hb) PARA AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE

A avaliação da angiogênese foi realizada através de método colorimétrico a partir da medição do conteúdo de hemoglobina dos implantes pelo método de Drabkin & Austin (1932) adaptado como índice de neovascularização por Plunkett et al., (1990). As amostras foram analisadas nos tempos de 4, 7 e 14 dias. No dia da retirada dos implantes os animais foram sacrificados e os implantes removidos avaliados. Aqueles implantes que na análise macroscópica apresentaram indícios de hemorragia ou infecções foram descartados.

Os implantes foram pesados e homogeneizados em 2 mL de reagente de Drabkin (Kit de dosagem hemoglobina-Labtest). O homogenato foi centrifugado por 20 min a 4000g e o sobrenadante filtrado em filtro 0.22 μ m (Millipore). A concentração de hemoglobina das amostras foi determinada através de leitura espectrofotométrica a 540 nm, usando leitor de ELISA. A concentração de hemoglobina foi obtida comparando-se as leituras obtidas com uma curva padrão previamente estabelecida e foi expressa em μ g Hb/mg de tecido.

3.14. AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CITOCINA TNF- α , VEGF e TGF- β 1 PRODUZIDAS NOS IMPLANTE DE ESPONJA

O implante retirado após 4, 7 e 14 dias foi homogeneizado para a dosagem de hemoglobina. Foram adicionados 100 μ L do sobrenadante em 500 μ L de PBS pH 7,4 contendo 0,05% de Tween-20 e centrifugado a 12.000g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi usado para realização do imunoenensaio.

As concentrações de VEGF, TNF- α e TGF- β 1 foram determinadas no sobrenadante utilizando-se o kit da R&D Systems (USA) específico para cada citocina e de acordo com o protocolo do fabricante. O ensaio foi realizado usando placa de microtitulação (ELISA) sensibilizada com anticorpo primário (policlonal anti-camundongo) específico para a

citocina a ser avaliada e incubada a 4 °C durante a noite. Após lavagem foi adicionado tampão de bloqueio para bloquear os sítios de ligação inespecíficos. Os padrões e amostras foram adicionados a placa após lavagem e incubados a 4 °C durante a noite. Nova lavagem foi seguida da adição de anticorpo de detecção apropriado e incubação durante 2 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem e adição do conjugado estreptavidina-peroxidase e incubação por 30 min. à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada, foi adicionado OPD (1,2-Diaminobenzidina) diluído em tampão citrato a 0,03M pH 5,0 contendo 0,02% de H₂O₂ 30 v/v. A placa foi incubada abrigada da luz durante 30 min. A reação foi paralisada por adição de H₂SO₄ a 1M. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro a 492 nm. Os resultados foram expressos em pg (picogramas)/mg de tecido.

3.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para estabelecer o numero de animais por grupo de tratamento foram conduzidas análises estatísticas para determinação do tamanho da amostra, a um nível de significância de $p < 0,05$.

A análise do intervalo de confiança da média nos experimentos pilotos (para as dosagens bioquímicas e análises morfométricas) mostrou que as variáveis estudadas apresentaram baixos valores de erro padrão e que com $n=10$ animais e $n=15$ campos há confiabilidade nos resultados.

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados foram representados pelas médias \pm erro padrão. A comparação entre os dois grupos foi feita utilizando-se o teste t de Student. Todos os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$ utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO ORGANOLÉPTICA DA PRÓPOLIS DE JAGUARAÇÚ

Considerando-se a cor, o aroma e o aspecto das amostras de própolis coletadas, poucas variações foram observadas (TABELA 1). A própolis produzida de setembro de 2005 a agosto de 2006 apresentava coloração totalmente verde, bastante aromática e maleável à temperatura ambiente (quebradiça, mas não ressecada). Nos meses de junho a agosto observou-se um pequeno acúmulo de umidade na face interna da própolis produzida nas frestas, passando de totalmente verde a para verde na face externa e amarela a marrom na superfície da face interna (TABELA. 1)

A (FIG. 3) ilustra o momento do pouso e coleta de abelha *Apis mellifera* (africanizada) sobre ápices vegetativos de *Baccharis dracunculifolia*.



FIGURA 3- Coleta ápice vegetal (CA = coleta de ápice, FJ = folha jovem; GI= glossa; MC = Material coletado).

TABELA 1- Características organolépticas das amostras de própolis coletadas no Município de Jaguaraçu.

MÊS/ANO	COR	AROMA	ASPECTO
Setembro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Outubro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Novembro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Dezembro/2005	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Janeiro/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Fevereiro/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Março/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Abril/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Maio/2006	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não ressecada ou ressecada)
Junho/2006	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Julho/2006	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Agosto/2006	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)

4.2. ANÁLISE DO TEOR DE FLAVONÓIDES EM FUNÇÃO DO SOLVENTE

No presente estudo comparativo, pôde-se determinar o teor de flavonóides de extratos de amostra de própolis verde utilizando diferentes solventes e misturas de solventes, podendo assim correlacionar os resultados encontrados.

Aplicando-se a metodologia apropriada, foi obtida a curva padrão (TABELA 2, GRÁF. 1).

TABELA 2- Absorbância das diferentes concentrações de flavonóides das amostras para determinação da curva padrão.

Concentração das Amostras	Absorbância a 425 nm
4 µg/mL	0,007
6 µg/mL	0,010
8 µg/mL	0,022
10 µg/mL	0,025
12 µg/mL	0,028

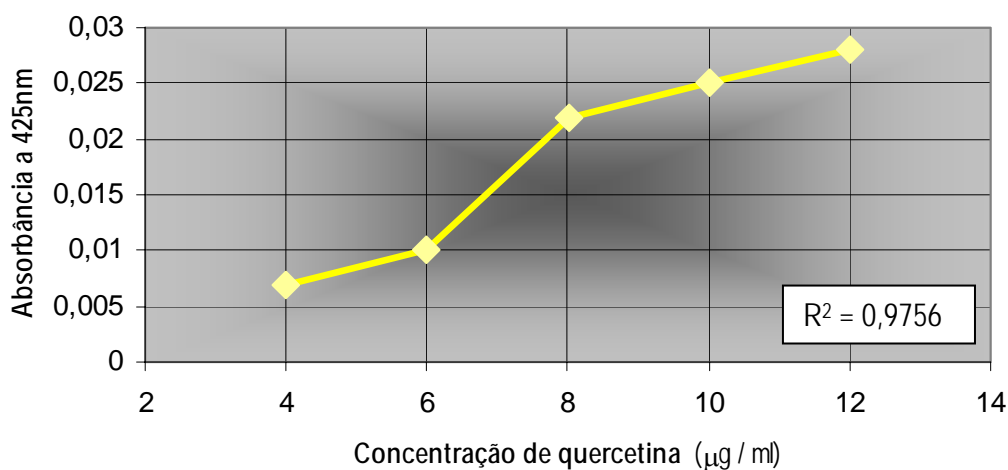


GRÁFICO 1-. Curva padrão de flavonóides

Após a obtenção da curva padrão, tornou-se possível a análise da concentração de flavonóides nos extratos, demonstrando que o extrato etanólico a 70% foi o melhor solvente para extração de flavonóides da própolis verde. Em contra partida, o extrato aquoso foi aquele que apresentou a concentração mais reduzida de flavonóides como mostrado na (TABELA 3).

TABELA 3- Concentração de flavonóides nos vários tipos de solventes usados nas extrações da própolis.

Amostra	Solvente	Absorbância	Concentração de flavonóides
Tubo 1	Aquoso	0,022	0,2375 g/L
Tubo 2	Etanol 50%	0,203	1,7875g/L
Tubo 3	Etanol 70%	0,280	2,4450g/L
Tubo 4	Etanol 80%	0,275	2,4025g/L
Tubo 5	Clorofórmio 70%	0,060	0,5625g/L
Tubo 6	Metanol 70%	0,212	1,8625 g/L
Tubo 7	Éter 70%	0,043	0,4175g/L
Tubo 8	Acetona 70%	0,223	1,9575g/L
Tubo 9	Etanol 70% e éter 30 %	0,184	1,6250 g/L
Tubo 10	Etanol 70% e acetona 30%	0,214	1,8800g/L

4.3. ANÁLISES QUÍMICAS

Conforme mostra a (TABELA 4), os principais constituintes da amostra do extrato aquoso própolis analisados foram: os cafeoilquínicos: ácidos 4,5-di-O-cafeoilquínicos (27,2%), 3,4-di-O-(E)-cafeoilquínicos (15,8%), didihydrocaffeoylquinic (13,8%) e 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínicos (8,0%). Outros ácidos cafeoilquínicos, tais como 4-O-(E)-cafeoilquínicos, ácido 5-O-(E)-cafeoilquínicos, ácido cinâmico e derivados, tais como artepilina C e drupanin constituintes aparecem em menor quantidade respectivamente (2,6, 4,4, 5,0 e 2,0 %) (TABELA 4).

Os picos 1, 2 e 3, com tempos de retenção (TR) 14,4, 17,6 e 20,9, respectivamente (TABELA 4), apresentam m/z 353, no meio negativo, em conformidade com a fórmula molecular $C_{16}H_{18}O_9$. Os correspondentes espectros UV são característicos de derivados de ácido cafeoilquínicos (UV \approx 298 e 325 nm). As intensidades relativas dos íons em cada espectro de ácido clorogênico isômeros foram significativamente diferentes, utilizando a condição MS/MS. MS/MS, de 5-O-(E)- ácido cafeoilquínicos foi indicado por um único pico m/z 191, enquanto MS/MS, de ácido 4-O-(E)-cafeoilquínicos foi indicado por m/z 173 com base no pico (100) e, além disso, mostrou fragmentos em m/z 179 (50) e 191 (60). MS/MS de 3-O-(E)- ácido cafeoilquínicos foi dominada por m/z 191 como base pico, acompanhado de um fragmento em m/z 179 (60). Ésteres do ácido caféico nas posições 3, 4 e 5 também são conhecidos respectivamente como neoclorogênico, criptoclorogênico e ácido clorogênico.

Picos 5, 6 e 7 (TR 29,0, 31,5 e 32,5, respectivamente, (TABELA 4) mostraram espectros UV de ácidos cafeoilquínicos idêntico aos descritos acima. Suas massas foram medidas de acordo com as massas protonadas ($[M + H]^+$) e deprotonadas ($[M - H]^-$) de di-O-(E)- ácidos cafeoilquínicos, 517,3 e 515,2, respectivamente (Tabela 1). Os dados sugerem identidade com isômeros posicionais de di-O-(E)- ácido cafeoilquínicos, com a fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{12}$ e peso molecular 516,0.

Picos 5 e 6 foram identificados por semelhança como 3,4-di-O-(E)-cafeoilquínicos e 3,5 - di-O-(E)- ácido cafeoilquínicos, respectivamente. O pico de 7, foi idêntico ao seu corresponde ácido 4,5-di-O-(E)- cafeoilquínico. A base de pico de MS/MS dos espectros dos compostos 5/7 é m/z 353, que resulta da perda de um fragmento caffeoyl; é, portanto, coerente com os ácidos cafeoilquinico. O MS/MS do ácido 3,4-di-O-(E)- cafeoilquínicos no pico 5, (TABELA 4) foi indicado por m/z 353 (100) e continha fragmentos em m/z 191

(30), 179 (60) e 173 (25), MS/MS de ácido 3,5-di-O-(E)-cafeoilquínicos (pico 6, TABELA 4) foi indicado por m/z 353 (100) e continha fragmentos em m/z 191 (45), 179 (40) e 173 (20), enquanto a MS/MS do ácido 4,5-di-O-(E)-cafeoilquínicos, pico 7, (TABELA 4) foi indicado por m / z 353 (100) e continha fragmentos em m / z 191 (20), 179 (20) e 173 (20).

O pico 4 foi identificado por semelhança como um derivado do ácido didihidro-cafeoilquinico. O seu espectro UV é idêntico aos espectros dos ácidos cafeoilquínicos. O composto mostrou [M - H] - a m / z 519,2 e [M + H] + em m / z 521,4, coerente com a fórmula molecular C₂₅H₂₈O₁₂ e massa molecular 520,0, o que corresponde a 4 Da acima das massas moleculares dos ácidos di-O- (E)-cafeoilquínicos. Os picos 8 e 9 têm característica de espectros UV de derivados do ácido cinâmico (315 nm) e [M - H] - a m / z 231,2 e 299,5, respectivamente, consistentes com os conhecidos componentes drupanin e artepilina C, da própolis verde respectivamente.

TABELA 4- Dados cromatográficos e espectométricos dos constituintes presentes no extrato aquoso da própolis verde de Minas Gerais (Sul do Brasil) obtidos por HPLC/ESI/MS (high pressure liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectroscopy).

Picos	Tempo de Retenção (min)	Quantidade Relativa (%)	UV (nm)	[M+H] ⁺ m/z	[M-H] ⁻ m/z	Identificação Proposta
1	14.4	1.2	ND	355.2	353.4	3-O-(E)-ácido cafeoilquinico
2	17.6	4.4	300sh, 330	355.2	353.1	5-O-(E)-ácido cafeoilquinico
3	20.9	2.6	300sh, 330	355.2	353.1	4-O-(E)-ácido cafeoilquinico
4	27.1	13.8	300sh, 330	521.4	519.2	ácido dihidrocaffeilquinico
5	29.0	15.8	300sh, 330	517.3	515.2	ácido3,4-di-O-caffeoilquinico
6	31.5	8.0	300sh, 330	517.3	515.2	ácido3,5-di-O-(E)-caffeilquinico
7	32.5	27.2	330	ND	515.2	ácido4,5-di-O-(E)-caffeilquinico
8	41.3	2.0	315	ND	231.2	ácido4-hidroxi-3-prenil-cinâmico (drupanin)
9	47.0	5.0	315	ND	299.5	ácido4-hidroxi-3,5-diprenil-cinâmico (artepilina C)

ND: não determinado

4.4. CARACTERIZAÇÃO DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA

O processo de formação do tecido fibrovascular instalado na matriz esponjosa e os efeitos do extrato aquoso de própolis (500mg/kg) foram evidenciados através de exame histológico e morfométrico dos implantes, estudos da infiltração de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) e da cinética de vascularização. Além disso, evidenciou-se a participação de citocinas durante o processo de angiogênese inflamatória induzido pelo implante de esponja.

4.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA ANGIOGÊNESE INFLAMATÓRIA

A matriz esponjosa foi bem tolerada por todos os animais. Nenhum sinal de infecção ou rejeição do implante foi observado no compartimento da esponja durante os 14 dias do experimento. A administração sistêmica da própolis (500 mg/kg), durante todo período experimental (4, 7 e 14 dias) não mostrou sinais de toxicidade, tais como perda de peso, sedação, ou alterações na atividade motora dos animais.

Os implantes de ambos os grupos, após coloração com (HE) mostraram crescimento de um estroma fibrovascular nos três intervalos de tempo estudados (4, 7 e 14 dias após o implante de esponja). As alterações histológicas durante o desenvolvimento do tecido fibrovascular são ilustradas na (FIG.4A- F). No dia 4, os implantes do grupo controle mostraram um acúmulo de células inflamatórias aparentemente maior em comparação com o grupo tratado. Do 7^o até o 14^o dia, as esponjas apresentavam-se mais vascularizadas e continham muito mais células inflamatórias, células gigantes multinucleadas e fibroblastos no tecido de granulação quando comparadas as esponjas do grupo tratado com própolis.

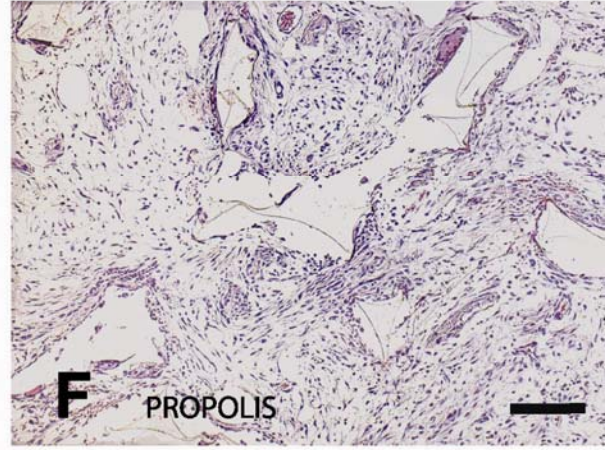
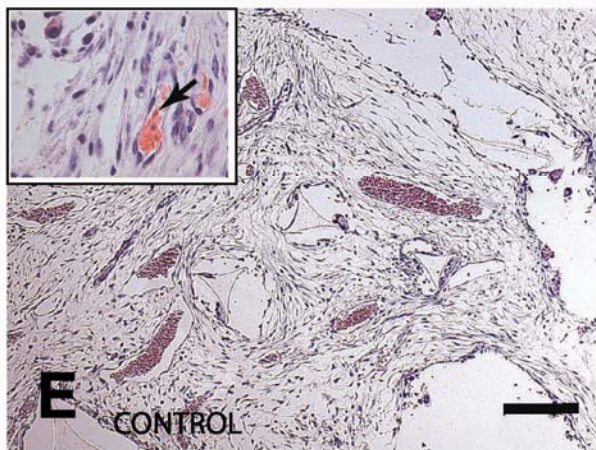
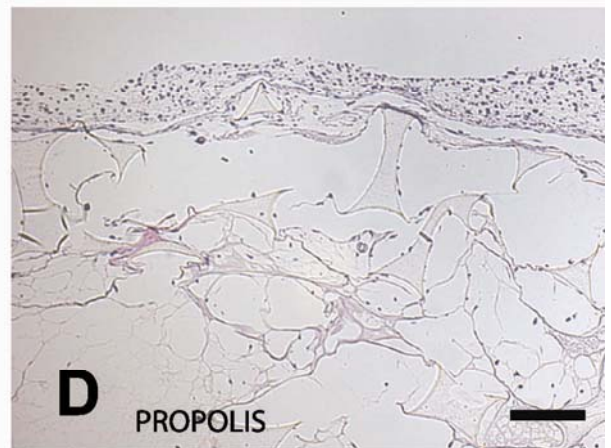
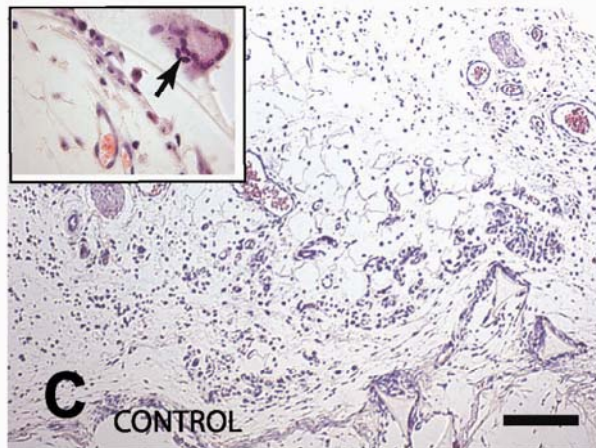
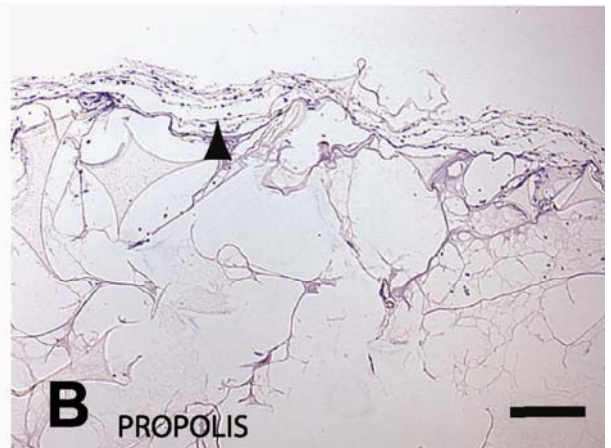
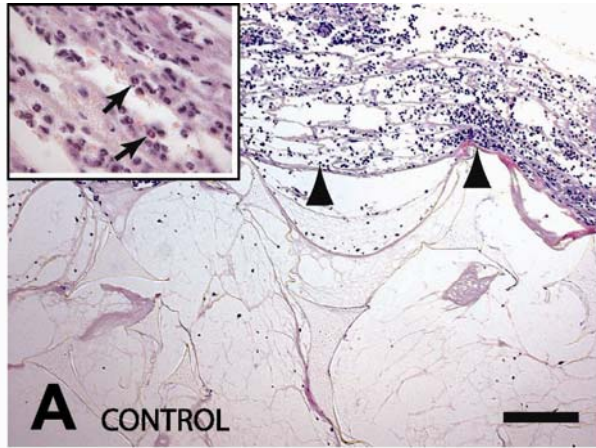


FIGURA 4 A-F -Cortes histológicos (5 μm , HE) representativos dos implantes de esponja dos grupos controle e tratado com própolis durante 4 (A e B), 7 (C e D) e 14 dias (E e F) respectivamente. O implante de esponja (*) foi progressivamente preenchido por células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas (tecido de granulação). A intensidade do infiltrado inflamatório nos implantes é maior nos grupos controle (A, C e E) em comparação com os grupos tratados (B, D e F) em todos os tempos estudados. O tecido de granulação do grupo controle é mais denso e mais vascularizado quando comparado com o grupo tratado. Os destaques (400x) mostram células inflamatórias em A (seta), célula gigante em C (seta), vaso sanguíneo em E (seta). Barra = 16 μm .

4.6. INFILTRADO INFLAMATÓRIO

A infiltração celular e a deposição de matriz extracelular nos implantes foram avaliadas quantitativamente a partir do peso úmido das esponjas e análise morfométrica em cortes histológicos corados pelo HE.

O peso úmido dos implantes dos animais do grupo controle foi significativamente superior ao do grupo tratado no tempo de 7 dias pós-implante (GRÁF. 2A).

A análise morfométrica da área ocupada pelo tecido fibrovascular (μm^2) cresceu ao longo de todo período de implantação em ambos os grupos. No entanto, a área fibrovascular no grupo tratado foi significativamente menor em comparação com o grupo controle nos tempos 4 e 7 dias pós-implante (GRÁF. 2B). Ambos os parâmetros, portanto, corroboram a avaliação histológica (FIG.4).

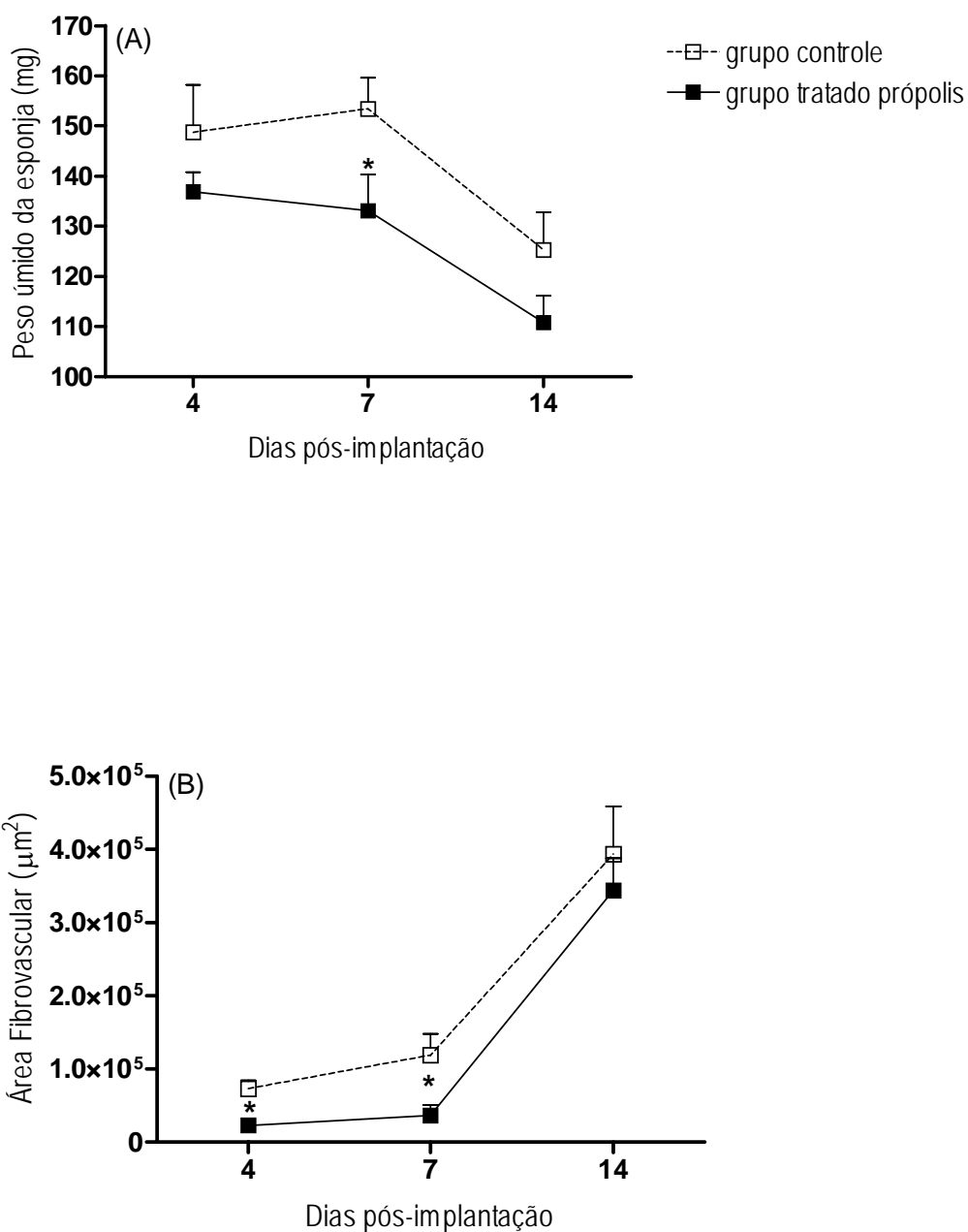


GRÁFICO 2- Peso úmido (A) e área fibrovascular (B) dos implantes dos grupos controle e tratado com própolis. No grupo tratado o peso úmido foi significativamente menor do que no grupo controle no 7º dia. A área fibrovascular no grupo tratado foi significativamente reduzida em comparação ao grupo controle nos tempos de 4 e 7 dias pós-implante. Os resultados estão representados como média \pm e.p. m. (n= 8-10). * $P < 0,05$.

4.7. AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NOS IMPLANTES DE ESPONJA

Os componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzidos pelo implante de esponja foram avaliados através de ensaios que correlacionam a atividade enzimática com a quantidade de células inflamatórias recrutadas na lesão durante a inflamação. A quantidade de neutrófilos recrutada (avaliado como atividade MPO) (GRÁF. 3A) não foi afetada pelo tratamento com própolis em nenhum dos tempos avaliados. Entretanto, o recrutamento de macrófagos (avaliado como atividade NAG) diminuiu (50%) no 14^o dia no grupo tratado em comparação ao grupo controle (GRÁF. 3B).

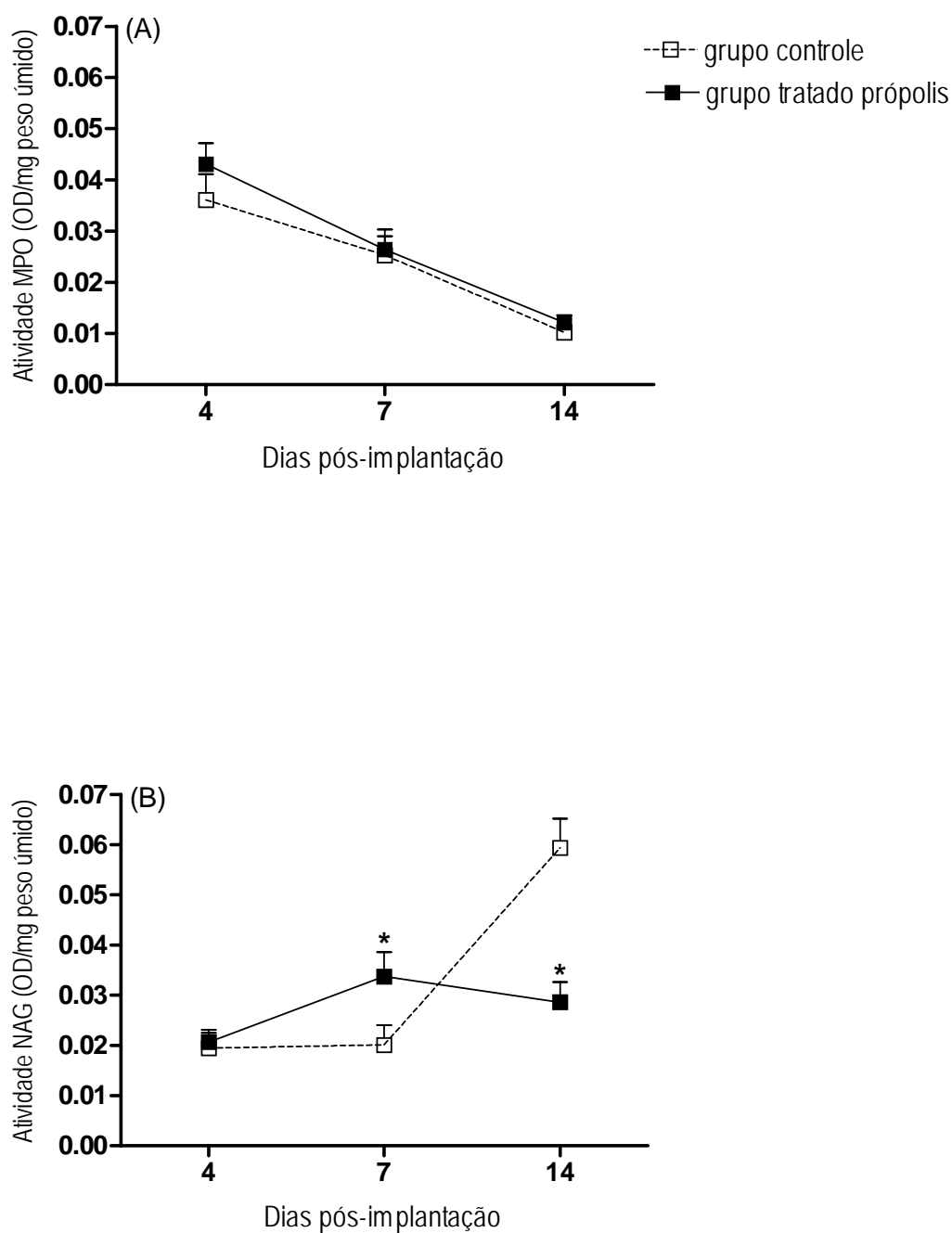


GRÁFICO 3A-B- Atividade de MPO (A) e NAG (B) nos implantes de esponja em animais dos grupos controle e tratado. O recrutamento de neutrófilos (atividade MPO) entre os dois grupos estudados foi progressivamente reduzido e sem diferenças significativas entre eles. O número de macrófagos ativados (atividade NAG) foi alterado tendo seu valor aumentado no tempo de 7 dias e níveis menores no tempo de 14 dias em relação ao grupo controle. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8-10). * $P < 0.001$.

4.8. AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE NOS IMPLANTES DE ESPONJA

Utilizando-se a dosagem do conteúdo de hemoglobina (Hb) das esponjas implantadas como um índice indireto da formação de novos vasos sanguíneos, pode-se estimar a vascularização do implante.

Dose diária de extrato aquoso de própolis (500mg/kg) administrada por gavagem para os diferentes grupos de camundongos causaram redução no conteúdo de hemoglobina dos implantes indicando uma diminuição do número de vasos. Uma diminuição significativa no conteúdo de hemoglobina foi observada nos dias 7 e 14 após o tratamento com própolis (GRÁF. 4A). Essa diferença foi confirmada pela análise morfométrica dos implantes mostrando um número de vasos significativamente menor no grupo tratado em comparação ao grupo controle (GRÁF. 4B).

Tendo em vista que o VEGF é considerado um marcador molecular da angiogênese, foram avaliados os níveis dessa citocina nos implantes. Curiosamente, os níveis de VEGF aumentaram progressivamente no grupo tratado com própolis, mas diminuíram no grupo controle (GRÁF. 4C).

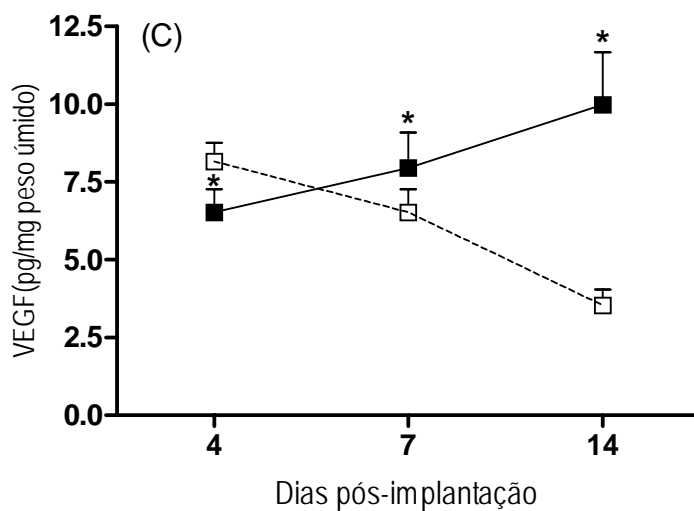
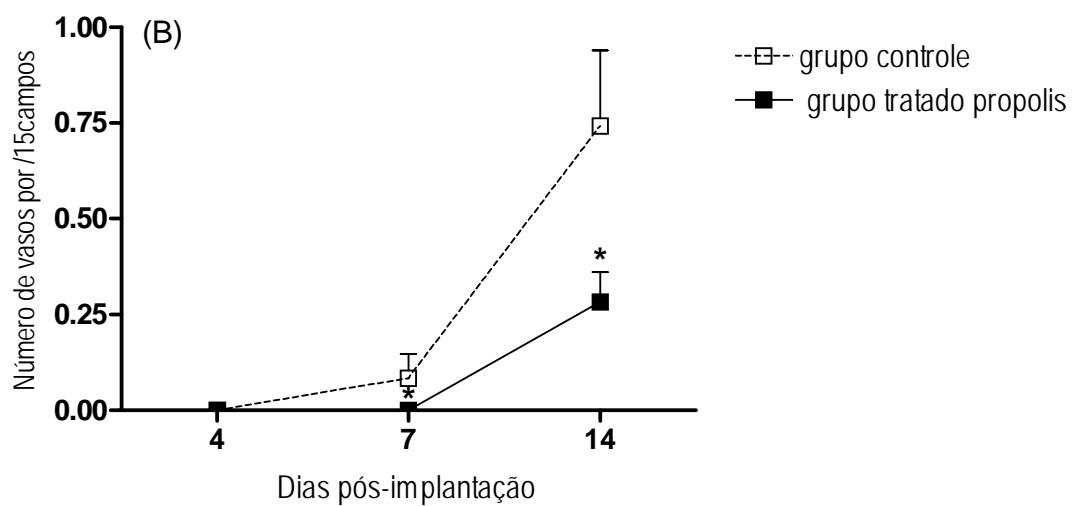
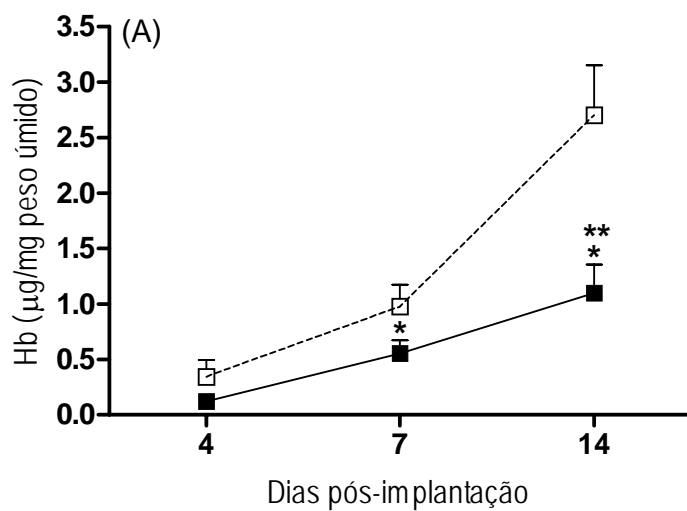


GRÁFICO 4A-C. Avaliação da angiogênese no implante de esponja em camundongos dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de própolis. Os níveis de hemoglobina (Hb) (A) e o número de vasos por campo (B) mostram uma redução significativa da angiogênese no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, em todos os tempos avaliados. O grupo tratado apresentou nível de VEGF crescente e significativamente elevado no 14^o dia. No grupo controle esse nível foi decrescente e reduzido no 7^o e 14^o dias (C). Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8-10). * $P < 0.001$.

4.9. AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS TNF- α E TGF- β 1 NOS IMPLANTES

O TNF- α é uma citocina com ações pró-inflamatória, pró-angiogênica e fibrolítica. O nível de TNF- α no implante foi maior no 7º dia no grupo controle e no 14º dia no grupo tratado com própolis (GRÁF. 5A). O nível de TGF- β 1 aumentou progressivamente em ambos os grupos, mas no grupo tratado no 14º dia pós-implante houve uma significativa redução de seu nível (GRÁF. 5B).

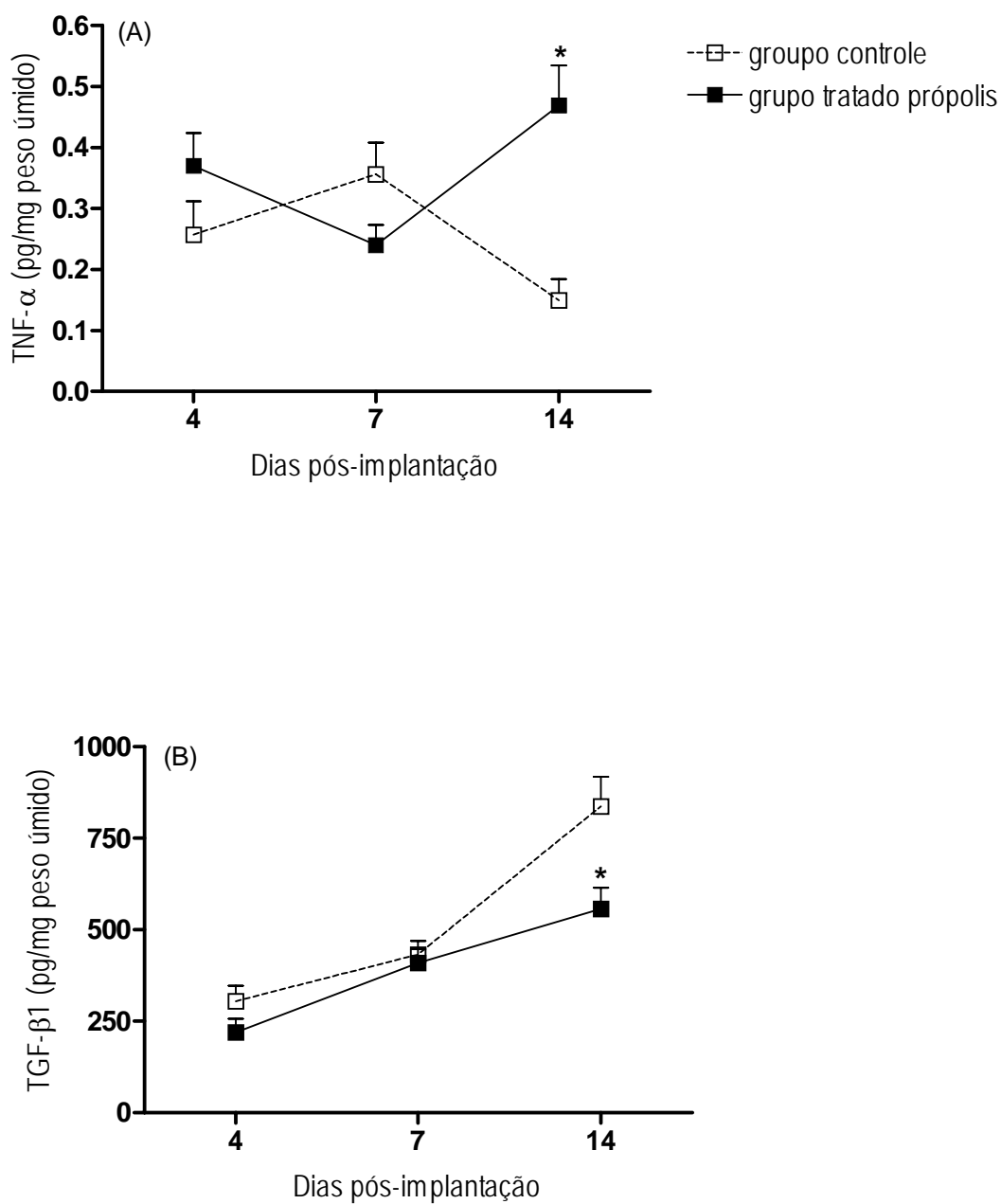


GRÁFICO 5A-B- Níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (A) fator de crescimento transformante beta (TGF- β 1) (B) nos implantes de esponja. Os níveis de TNF- α foram crescentes em relação ao grupo controle e significativamente maior no 14^o dia nos animais tratados com própolis. Os níveis de TGF- β 1 foram crescentes do em ambos os grupos. Nos animais tratados nos tempos de 4 e 14 dias o nível de TGF- β 1 foi menor que no grupo controle. Os resultados foram expressos em média \pm e.p.m. (n=8-10). * $P < 0.05$.

4.10. FORMAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR E DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO

A cinética da deposição e o tipo de colágeno nos implantes de esponja nos grupos controle e tratado do 4^o ao 14^o dia foi determinado por análises morfométrica e densitométrica usando coloração com Picrosirius-red (FIG. 5A-F; GRAF. 6A-B). Os resultados mostraram um aumento significativo e progressivo da deposição de colágeno (tipo III e I) na matriz extracelular nos grupos controle e tratado. Entretanto, no grupo tratado com própolis a deposição de colágeno tipo III e I é significativamente menor (GRAF. 6A- B). A análise densitométrica dos implantes corados com Picrosirius-red (FIG. 5A-F) mostra um aumento progressivo dos dois tipos de colágeno o fino (área verde, tipo I) e o denso (área amarela e vermelha, tipo III) confirmando os achados observados no (GRAF. 6A-B).

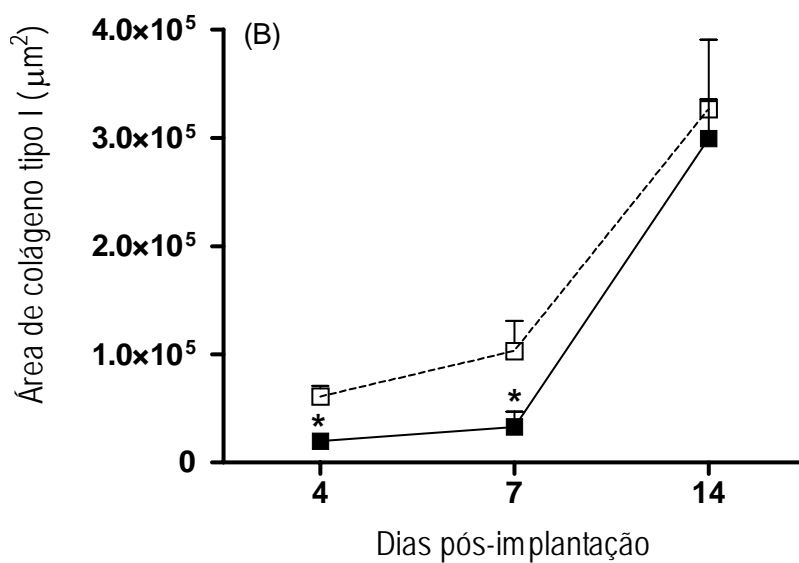
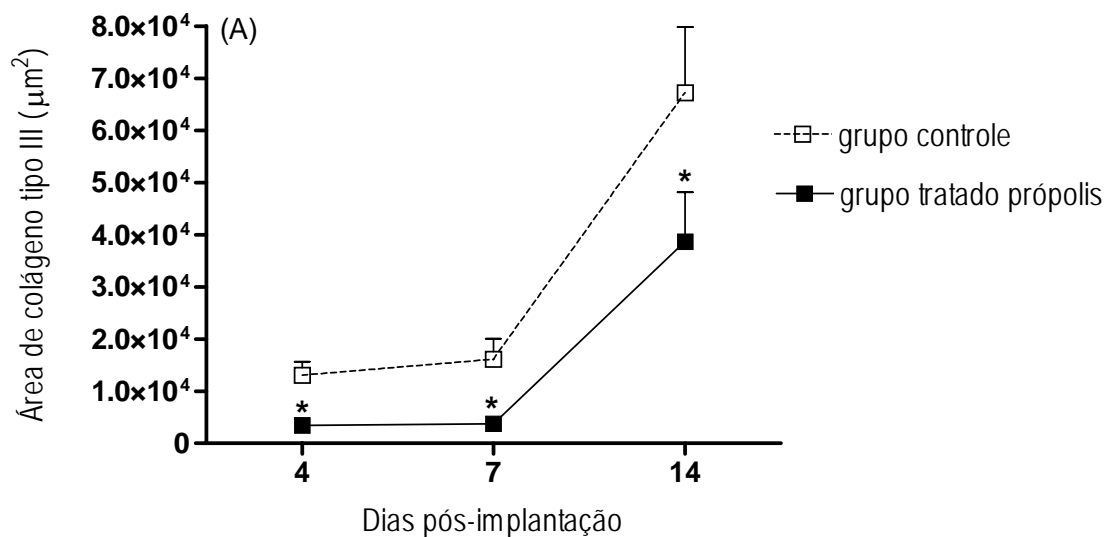


GRÁFICO 6A e B. Análise morfométrica da deposição de colágeno fino, tipo III (A) e denso, tipo I (B) nos implantes de esponja. A deposição de colágeno III nos implantes é significativamente menor no grupo tratado nos tempos de 4 a 14 dias e o tipo I é menor do 4º e 7º dia pós-implante. Os dados estão representados como média \pm e.p. m. (n=8-10). * $P < 0,05$.

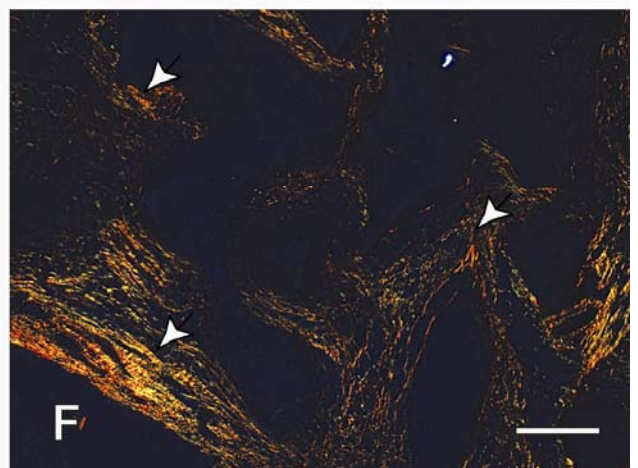
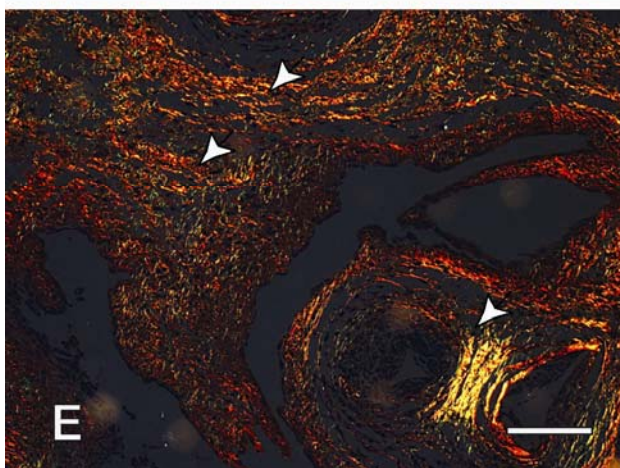
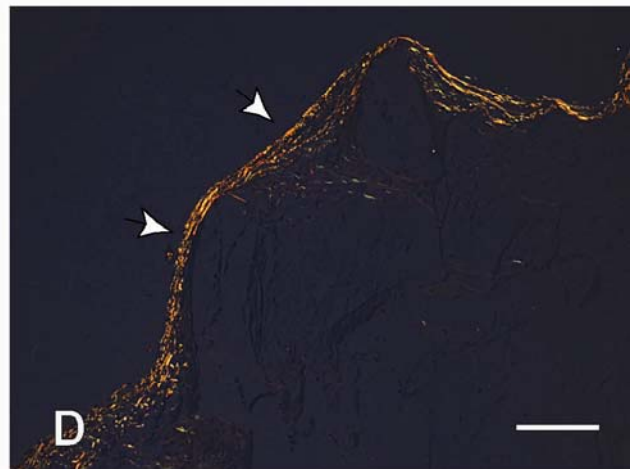
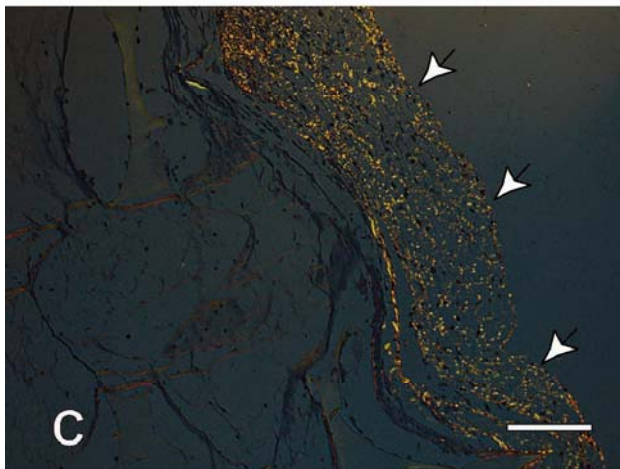
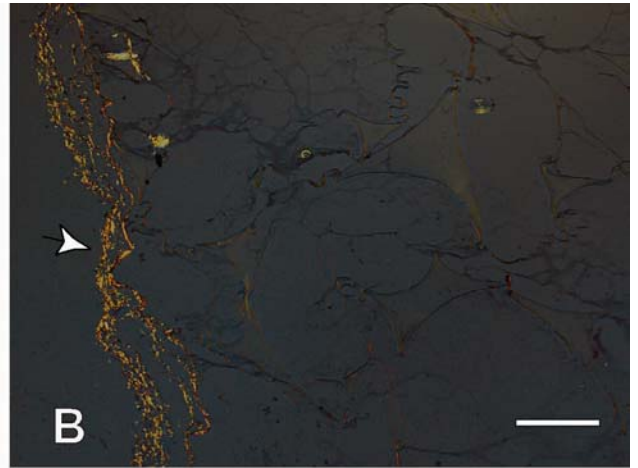
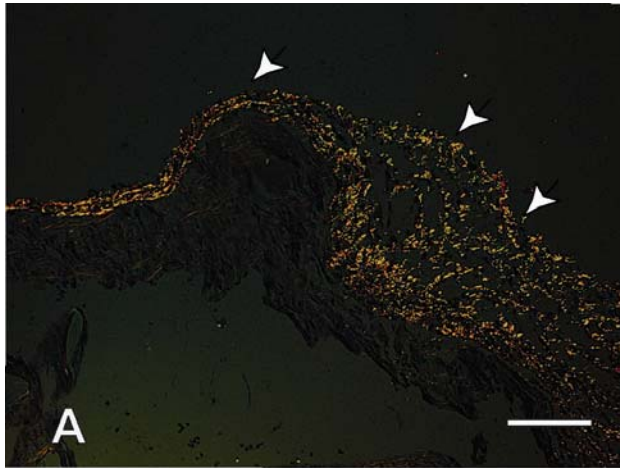


FIGURA 5 A-F Cortes histológicos (5 μ m, Picosirius-red) dos implantes de esponja para avaliação do tipo de colágeno. A deposição de colágeno tipo III fibras de finas (área verde) ocorre até o 7^o dia pós-implante, em ambos os grupos. No 14^o dia a matriz esponjosa é predominantemente ocupada por fibras tipo I de colágeno denso (área amarela e vermelha) nos implantes dos grupos tratado e controle. A área de colágeno do grupo tratado com própolis foi significativamente reduzida em comparação ao grupo controle nos tempos de 4, 7 e 14 dias pós-implantação. (Setas mostram as áreas de maior deposição).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foram caracterizados bioquimicamente os principais componentes dos extratos etanólico e aquoso da própolis verde obtida em Jaguarapu/MG, também foram avaliados os efeitos da administração sistêmica do composto aquoso na angiogênese inflamatória em um modelo murino de implantes de esponjas.

O aspecto panorâmico típico da própolis oriunda de Jaguarapu demonstrou riqueza de grandes fragmentos de folhas, sendo a mais abundante a *Baccharis dracunculifolia* que é a espécie predominante da região. Bastos (2001), estudando amostras de própolis também produzidas em Minas Gerais, por meio de procedimento analítico proposto por Warakomska & Maciejewicz (1992), confirma nossos achados de que a própolis verde das localidades avaliadas originaram-se de *B. dracunculifolia*, por possuírem inúmeros fragmentos dessa planta em seu sedimento. Essa confirmação foi realizada por meio de estudo anatômico, utilizando microscopia fotônica e microscopia eletrônica de varredura. Segundo a autora, a própolis verde de aspecto resinoso e quebradiço apresenta em sua análise microscópica 90 a 100% de fragmentos epidérmicos, tricomas glandulares e tectores somados e até 1% de outras fontes resiníferas, o que comprova a preferência de ápices de *B. dracunculifolia*, por abelhas *A. mellifera* africanizada para a produção de própolis no Brasil onde essa espécie vegetal é freqüente.

No presente estudo comparando-se o teor de flavonóides dos extratos etanólico e aquoso da amostra de própolis verde utilizando diferentes solventes e misturas de solventes, foi possível observar que o teor de flavonóides no extrato aquoso foi menor (aproximadamente 10 vezes) em relação ao extrato etanólico. Além disso, foram detectados ácidos clorogênicos (uma família de ésteres contendo ácido quinico trans-cinâmico e certos ácidos, mais comumente cafeico, p-cumárico e ferúlico). Nos resíduos de ácidos trans-cinâmico, que podem ser fixados a um ou mais hidroxilas nas posições 1, 3, 4 e 5 do ácido quinico, originam-se uma série de isômeros posicionais. Esses compostos predominaram no extrato aquoso analisado. Embora amplamente estudado por muitos anos, a identificação precisa destes compostos nos extratos vegetais é difícil devido à falta de padrões comerciais e as limitações em se distinguir fielmente isômeros posicionais quando múltiplas formas estão presentes em baixas concentrações (Clifford et al., 2006). Ácidos mono e di-cafeoilquínicos têm sido relatados como principais compostos do extrato

aquoso da própolis brasileira (Shimazawa et al., 2005). A família Asteraceae é conhecida por ser particularmente diversificada quanto ao conteúdo de ácidos clorogênicos. Algumas, mas nem todas as suas espécies são capazes de esterificar todas as quatro hidroxilas do ácido quinico, não só em vários ácidos cinâmicos, mas também em ácido succínico (Clifford et al., 2006). A fonte de própolis verde, *Baccharis dracunculifolia*, é de um membro da família Asteraceae (Salatino et al., 2005; Teixeira et al., 2005). Portanto, para que a identificação dos constituintes químicos presentes em amostras de própolis possa ser utilizada na determinação da sua origem botânica, faz necessário o estabelecimento de um paralelo entre os compostos químicos presentes nas amostras e aqueles presentes em secreções ou em extratos obtidos de partes de vegetais do local de coleta, enfocados como possíveis fontes visitadas para esse fim. Sem este tipo de avaliação conjunta, a estratégia de análise exclusivamente das amostras torna-se insuficiente: por um lado, em função da amplitude com que certos compostos encontram-se distribuídos no reino vegetal, e por outro, em função das dificuldades vigentes sobre a possibilidade do uso de certo composto essa sistemática só é válida se todas as espécies de um gênero forem investigadas, sendo necessária a garantia de uma amostragem adequada, com um grande número de membros de uma espécie avaliados, em diferentes estágios de desenvolvimento e em diferentes ambientes (Vickery & Vickery, 1981).

Considerando que grande parte dos estudos biológicos com a própolis foi feita utilizando-se o extrato etanólico e, portanto indiretamente investigando os efeitos dos flavanóides nosso principal interesse no presente trabalho foi avaliar as ações do extrato aquoso cujos componentes mais abundantes identificados foram membros da família do ácido clorogênico. Tem sido relatado que compostos fenólicos exercem uma grande variedade de propriedades biológicas, tais como capacidade para realizar atividade antioxidante pelo seqüestro de radicais livres, dentre eles os derivados do óxido nítrico, o que pode acelerar a cicatrização de feridas cutâneas (Nakajima et al., 2007; Serarslan et al., 2007; Sehn et al., 2009). Outras atividades da própolis avaliadas em animais experimentais têm revelado efeitos benéficos em inflamações agudas, crônicas (Hu et al, 2005; de Barros, 2007; Paulino et al., 2008) e na angiogênese. Embora alguns estudos já tenham avaliado o efeito do extrato aquoso de outras amostras de própolis e de componentes do ácido cafeico em processo inflamatórios, não encontramos na literatura qualquer trabalho que investigou componentes relevantes da angiogênese inflamatória (recrutamento celular, formação de

novos vasos sanguíneos e deposição de matriz extracelular). O modelo de implante de esponja utilizado neste trabalho tem sido eficaz em induzir a formação de um tecido fibrovascular caracterizado por parâmetros bioquímicos, funcionais e histológicos (Walsh, et al., 1997; Andrade et al., 1987).

Os experimentos que avaliaram os efeitos sistêmicos do extrato aquoso de própolis mostraram que a técnica de implantação induziu a formação de um estroma fibrovascular que diferiu importantemente do grupo controle quanto ao desenvolvimento seqüencial da inflamação, angiogênese, produção de citocinas e deposição da matriz extracelular.

O tecido fibrovascular ocupou progressivamente os poros da matriz esponjosa preenchendo os implantes com células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas. O tecido de granulação nos implantes do grupo controle era mais denso e mais vascularizado, em comparação ao grupo tratado com própolis. Isto refletiu no peso úmido dos implantes que foi mais leve no grupo tratado. Outra confirmação deste achado foi dada pelo tamanho da área fibrovascular que foi de 35% (4^o dia) a 70% (7^o dia) maior no grupo controle na fase inicial do processo. Os resultados obtidos estão de acordo com o trabalho de outros autores, que utilizando diferentes modelos de cicatrização, mostraram uma diminuição no recrutamento celular após o tratamento com própolis (Ghisalbert, 1979; Khayyal et al., 1993; Hu et al., 2005; Paulino et al., 2008;)

Os componentes inflamatórios dos implantes foram avaliados por enzimas e citocinas inflamatórias. No grupo tratado com própolis a atividade de MPO (representado pelo número de neutrófilos ativados) não foi afetada pelo tratamento. O composto, porém foi capaz de inibir acentuadamente a atividade NAG (representada pelo número de macrófagos/monócitos ativados) no 14^o dia pós-implantação, sugerindo um grau de seletividade da própolis nesta população celular. Nossos resultados estão de acordo com os de Orsolich, 2005 que mostrou uma diminuição no recrutamento de macrófagos na cavidade peritoneal de animais tratados com extrato aquoso de própolis.

A avaliação da angiogênese pelo conteúdo de Hb (índice vascular indireto) das esponjas e pela análise morfométrica mostrou aumento progressivo em ambos os grupos, porém com menor intensidade no grupo tratado com própolis. Já foi demonstrado que o extrato da própolis foi capaz de suprimir a angiogênese na córnea de coelhos lesada por cauterização com nitrato de prata e também em experimentos com membrana córneo-

alantóide de embrião de galinha (Song et al., 2002; Ahn et al., 2007). Nosso modelo de angiogênese difere importantemente dos sistemas acima mencionados, particularmente pelo seu componente inflamatório, portanto é possível atribuir à própolis efeitos tanto no componente inflamatório quanto vascular. Curiosamente, os níveis da citocina pró-angiogênica, VEGF, apresentaram um padrão diferente de produção em ambos os grupos. Assim, enquanto no grupo tratado com própolis os níveis aumentaram progressivamente, no grupo controle a produção desta citocina diminuiu no 7^o dia pós-implantação. Esta falta de correlação entre os níveis de VEGF e o conteúdo Hb do grupo controle é totalmente compatível com a idéia de que na ausência de hipóxia e / ou estresse oxidativo, os níveis de VEGF poderiam diminuir (Ikeda et al., 1995; Ferrara, 1999). É possível que o fornecimento de sangue (conteúdo de Hb e número de vasos), no compartimento do implante a partir do 7^o dia no grupo controle tenha sido suficiente para atender a demanda metabólica local resultando em um efeito inibitório do sinal para produção do VEGF. Inversamente, no grupo tratado (própolis) a diminuição da angiogênese estimulou a produção de VEGF para compensar o suprimento sanguíneo deficiente no compartimento do implante.

O padrão de produção do TNF- α e TGF- β 1 (duas relevantes citocinas pró-inflamatória/fibrolítica e fibrogênica) também foi influenciado pelo extrato aquoso da própolis. O pico do TNF- α no grupo controle se deu no 7^o dia enquanto que no grupo tratado com própolis o pico ocorreu no 14^o dia. Diferentemente, a cinética da produção de TGF- β 1 nos implantes apresentou cursos paralelos em ambos os grupos, mas a produção desta citocina foi aproximadamente 1,5 vezes maior no grupo controle em relação ao grupo tratado no 14^o dia. Esses resultados indicam claramente que os efeitos da própolis em nosso sistema possam ter ocorrido através da modulação destas citocinas fibrogênica versus fibrolítica que são totalmente compatíveis com seus efeitos na regulação da deposição da matriz extracelular na cicatrização de feridas (Leask & Abraham, 2004).

A deposição do colágeno após uma lesão é um marco do reparo tecidual. Tem sido demonstrado que as fibras que compõem a área cicatricial são de colágeno do tipo I (fibras densas), e colágeno tipo III (fibras finas) (Kyriakides et al., 2005). Nesse trabalho, a coloração com Picrosirius red mostrou dois padrões distintos de colágeno depositados no interior da matriz esponjosa. A deposição deste componente extracelular aumentou progressivamente a partir do 4^o dia até o 14^o dia, e as fibras se tornaram espessadas, mudando de verde (Tipo III) para amarelo/vermelho (tipo I), em ambos os implantes. Esse

perfil da deposição de colágeno nos implantes de esponja é compatível com trabalhos anteriores no modelo, bem como em outros tipos de matrizes sintéticas e em feridas abertas e incisionais (Opalenik & Davison, 2005; Campos et al., 2006). No grupo tratado com própolis, no entanto, houve um retardo na taxa de deposição de colágeno na fase inicial (dias 4 e 7 pós-implantação), mas atingiram os níveis do grupo controle no 14^o dia. Os resultados estão em contraste com os achados de Killicoglu et al., (2008) que mostraram uma aceleração da cicatrização em anastomoses de cólon após administração sistêmica da própolis. Uma possível explicação para essa discrepância pode ser devido à natureza intrínseca dos tecidos avaliados. Outra possibilidade está relacionada com a variação espécie-geográfica da própolis, que pode determinar a sua composição química e atividades biológicas. Além disso, os métodos de extração (aquoso ou etanólico) constituem outra fonte de variabilidade. No entanto, os resultados obtidos mostram que, embora a própolis tenha suprimido importantes componentes do tecido fibrovascular (recrutamento celular, formação de vaso) a deposição de colágeno no 14^o dia não foi afetada pelo composto.

Este trabalho avaliou os efeitos do extrato aquoso da própolis verde nos múltiplos parâmetros dos principais componentes da angiogênese inflamatória revelando uma função moduladora na produção das citocinas pró-inflamatória e pró-fibrogênica sem comprometimento do reparo. Além disso, sugere que o extrato aquoso de própolis verde (Jaguaraçú/MG) poderá ser usado para controlar a resposta inflamatória prevenindo a formação de cicatrização hipertrófica, quelóide e processos cicatriciais deficientes.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ Os principais componentes do extrato aquoso da própolis verde de Jaguraçu (Minas Gerais-Brasil) identificados pelo HPLC/MS/MS são: mono e ácidos di-O-cafeoilquínicos; fenilpropanoide, sendo a artepilina C e drupanin detectados em pequenas quantidades.
- ✓ O tratamento sistêmico com extrato aquoso de própolis (500mg/kg) induziu alterações importantes no desenvolvimento sequencial da inflamação, angiogênese e no reparo tecidual.
- ✓ Mecanismos compensatórios de controle da fibrose e ativação da fibrólise foram estimulados pela própolis através das citocinas (VEGF, TNF- α e TGF- β).
- ✓ A própolis exerceu atividade antiinflamatória seletiva na recrutamento/ativação de macrófagos.
- ✓ O extrato aquoso da própolis verde brasileira pode ser usado para controlar a resposta inflamatória, sem comprometer o processo de reparo.
- ✓ A própolis apresenta-se como um potencial agente terapêutico para prevenção da cicatrização hipertrófica, formação de quelóide e processos cicatriciais deficientes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahn, M. R., K. Kunimasa, *et al.* Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artemisinic acid inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. Cancer Lett, v.252, n.2, Jul 18, p.235-43. 2007.

Apicultura. Disponível em: <http://www.breyer.ind.br/apicultura.htm>>Acesso em 14 jun. 2004.

Andrade, S. P., T. P. Fan, *et al.* Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. Br J Exp Pathol, v.68, n.6, Dec, p.755-66. 1987.

Asis, M. Propoleo- El oro purpura de las abejas. In: (Ed.). Habana: Centro de información y documentación Agropecuario (CIDA), 1991. Propoleo- El oro purpura de las abejas, p.256

Bagli, E., A. Xagorari, *et al.* Angiogenesis in inflammation. Autoimmun Rev, v.3 Suppl 1, Jun, p.S26. 2004.

Bailey, P. J. Sponge implants as models. Methods Enzymol, v.162, p.327-34. 1988.

Bankova, V., R. Christov, *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. Z Naturforsch [C], v.50, n.3-4, Mar-Apr, p.167-72. 1995.

Bankova, V. D., A.; Popov, S. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. Apidologie, v.23, p.79-85. 1992.

Bankova, V. S. C., S.L.D.; Marcucci, Mc. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, v.31, p.3-15. 2000.

Banskota, A. H., Y Tezuka, *et al.* Recent progress in pharmacological research of propolis. Phytother Res, n.7, v. 15,Nov, p. 561-571.2001.

Barcelos, L. S., A. Talvani, *et al.* Production and in vivo effects of chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a model of inflammatory angiogenesis in mice. Inflamm Res, v.53, n.10, Oct, p.576-84. 2004.

Bastos, E. M. A. F. Origem botânica e indicadores de qualidade de "própolis verde" produzida no Estado de Minas Gerais., Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001. 137 p.

Belo, A. V., F. Leles, *et al.* Murine chemokine CXCL2/KC is a surrogate marker for angiogenic activity in the inflammatory granulation tissue. Microcirculation, v.12, n.7, Oct-Nov, p.597-606. 2005.

Benjamin, L. E. The controls of microvascular survival. Cancer Metastasis Rev, v.19, n.1-2, p.75-81. 2000.

Bergers, G. e L. E. Benjamin. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer, v.3, n.6, Jun, p.401-10. 2003.

Bischoff, J. Cell adhesion and angiogenesis. J Clin Invest, v.100, n.11 Suppl, Dec 1, p.S37-9. 1997.

Blumenkrantz, N., R. Assad, *et al.* Characterization of collagen hydroxylsyl glycosyltransferases as mainly intramembranous microsomal enzymes. J Biol Chem, v.259, n.2, Jan 25, p.854-9. 1984.

Borrelli, F., P. Maffia, *et al.* Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. Fitoterapia, v.73 Suppl 1, Nov, p.S53-63. 2002.

Bradshaw, A. D., M. J. Reed, *et al.* Increased fibrovascular invasion of subcutaneous polyvinyl alcohol sponges in SPARC-null mice. Wound Repair Regen, v.9, n.6, Nov-Dec, p.522-30. 2001.

Breyer, E. U. Abelhas e saúde. União da Vitória, Uniporto gráfica e editora Ltda, p.40. 1980.

Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol, v.36, n.4, Apr, p.347-63. 1998.

Campos, P. P., S. P. Andrade, *et al.* Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. Histol Histopathol, v.21, n.12, Dec, p.1263-70. 2006.

Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med, v.6, n.4, Apr, p.389-95. 2000.

Cheng, P. C. W., G. Honeybee propolis: Prospects in medicine. Bee World, v.77, p.8-15. 1996.

Clark, R. A. Fibrin and wound healing. Ann N Y Acad Sci, v.936, p.355-67. 2001.

Clifford, M. N., S. Marks, *et al.* Characterization by LC-MS(n) of four new classes of p-coumaric acid-containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans. J Agric Food Chem, v.54, n.12, Jun 14, p.4095-101. 2006.

Creamer, D., M. H. Allen, *et al.* Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. Br J Dermatol, v.136, n.6, Jun, p.859-65. 1997.

Cross, A. S., S. Sakarya, *et al.* Recruitment of murine neutrophils in vivo through endogenous sialidase activity. J Biol Chem, v.278, n.6, Feb 7, p.4112-20. 2003.

De Barros, M. P., J. P. Sousa, *et al.* Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. J Ethnopharmacol, v.110, n.3, Apr 4, p.567-71. 2007.

Di Stasi, L. Plantas medicinais: arte e ciência. São Paulo: UNESP. 1996

Diegelmann, R. F., I. K. Cohen, *et al.* The role of macrophages in wound repair: a review. Plast Reconstr Surg, v.68, n.1, Jul, p.107-13. 1981.

Drabkin, D. L. Austin, J. H. Spectrophotometric constants common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. J. Biol. Chem, v.98, p.719-733. 1932.

Dvorak, H. F. Angiogenesis : update. J Thromb Haemost, v.8, p.1835-1842. 2005.

Dvork, H. F. Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. American Journal Pathology, v.162, p.1747-1757. 2003.

Ferrara, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. J Mol Med, v.77, n.7, Jul, p.527-43. 1999.

Ferreira, M. A., L. S. Barcelos, *et al.* Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO). Br J Pharmacol, v.141, n.7, Apr, p.1185-92. 2004.

Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med, v.1, n.1, Jan, p.27-31. 1995.

Folkman, J. e M. Klagsbrun. Angiogenic factors. Science, v.235, n.4787, Jan 23, p.442-7. 1987.

Fontana, J. D. P., M.; Santos, M.H.R.D.; Fontana, C.K.; Oliveira, B.H.; Schause, L.; Pontarolo, R.; Barbirato, M.A.; Ruggiero, M.A.; Lanças, F.M. Profiling propolis flavonoids by means of micellar electrokinetic capillary chromatography, capillary gas chromatography and bactericidal action. Chromatographia, v.52, p.147-151. 2000.

Garcia-Viguera, C. F., F.; Tomás-Barberán, F.A. Study of canadian propolis by GC-MS and HPLC Zeitschrift fur Naturforschung, v.48, p.634-637. 1993.

Gary, N. Activities and behavior of honey bees. In: The hive and the honey bee: J. M. Graham. (ed.). Michigan, Chelsea, p. 269-361 1993.

Gerber, H. P., F. Condorelli, *et al.* Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. J Biol Chem, v.272, n.38, Sep 19, p.23659-67. 1997.

Ghisalberti, E. L. Propoli: a review. Bee World, v.60, p.59-84. 1979.

Greenaway, W. S., T.; Whatley, F.R. The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. Bee World, v.71, p.107-118. 1990.

Grindlay, J. H. e J. M. Waugh. Plastic sponge which acts as a framework for living tissue; experimental studies and preliminary report of use to reinforce abdominal aneurysms. AMA Arch Surg, v.63, n.3, Sep, p.288-97. 1951.

Guerra, M. N., Ro. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Farmacognosia-da planta ao medicamento. Florianópolis-SC: Ed.UFSC. 2001

Hall, M. C., D. A. Young, *et al.* The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. J Biol Chem, v.278, n.12, Mar 21, p.10304-13. 2003.

Hart, J. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. J Wound Care, v.11, n.6, Jun, p.205-9. 2002.

Hepsen, I. F., H. Er, *et al.* Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. Ophthalmic Res, v.31, n.6, p.426-31. 1999.

Hirschi, K. K. D. A., P.A. Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. EXS, v.79, p.419-428. 1997.

Hornstra, I. K., S. Birge, *et al.* Lysyl oxidase is required for vascular and diaphragmatic development in mice. J Biol Chem, v.278, n.16, Apr 18, p.14387-93. 2003.

Hu, F., H. R. Hepburn, *et al.* Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. J Ethnopharmacol, v.100, n.3, Sep 14, p.276-83. 2005.

Hunt, T. K., D. R. Knighton, *et al.* Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. Surgery, v.96, n.1, Jul, p.48-54. 1984.

Ikeda, E., M. G. Achen, *et al.* Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. J Biol Chem, v.270, n.34, Aug 25, p.19761-6. 1995.

Jéane, F. La propolis et sa récolte par l'apiculteur. Bull Tech Apic, v.11, p.45-46. 1984.

Joly, C. O desenvolvimento de um modelo para viabilizar a conservação e o uso sustentável da biodiversidade brasileira. XXII Encontro de Botânicos SBB-Regional MG, BA e ES. Viçosa, MG, 2001. 66 p.

Keshet, E. Preventing pathological regression of blood vessels. J Clin Invest, v.112, n.1, Jul, p.27-9. 2003.

Khayyal, M. T., M. A. El-Ghazaly, *et al.* Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. Drugs Exp Clin Res, v.19, n.5, p.197-203. 1993.

Kilicoglu, S. S., B. Kilicoglu, *et al.* Ultrastructural view of colon anastomosis under propolis effect by transmission electron microscopy. World J Gastroenterol, v.14, n.30, Aug 14, p.4763-70. 2008.

Kim, W. J., G. K. Gittes, *et al.* Signal transduction in wound pharmacology. Arch Pharm Res, v.21, n.5, Oct, p.487-95. 1998.

Knighton, D. R., T. K. Hunt, *et al.* Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. Science, v.221, n.4617, Sep 23, p.1283-5. 1983.

Konstantinova, N. V., D. M. Duong, *et al.* Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts. J Invest Dermatol, v.107, n.4, Oct, p.615-21. 1996.

Kumar, V., Conran, Rs., Schoen, F.J. Robbins-Patologia Estrutural e Funcional

Editora Elsevier. 2005

Kyriakides, T. R., Y. H. Zhu, *et al.* Altered extracellular matrix remodeling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice. Am J Pathol, v.159, n.4, Oct, p.1255-62. 2001.

Lavan, F. B. e T. K. Hunt. Oxygen and wound healing. Clin Plast Surg, v.17, n.3, Jul, p.463-72. 1990.

Leask, A. e D. J. Abraham. TGF-beta signaling and the fibrotic response. FASEB J, v.18, n.7, May, p.816-27. 2004.

Leibovich, S. J. e R. Ross. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. Am J Pathol, v.78, n.1, Jan, p.71-100. 1975.

Liekens, S., E. De Clercq, *et al.* Angiogenesis: regulators and clinical applications. Biochem Pharmacol, v.61, n.3, Feb 1, p.253-70. 2001.

Majno, G. Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing. Am J Pathol, v.153, n.4, Oct, p.1035-9. 1998.

Marcucci, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Química Nova, v.19, p.529-535. 1996.

Marcucci, M. C., F. Ferreres, *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacol, v.74, n.2, Feb, p.105-12. 2001.

Marcucci, M. C. W., R.G.; Salatino, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Mensagem Doce, v.46. 1998.

Martin, P. e S. J. Leibovich. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. Trends Cell Biol, v.15, n.11, Nov, p.599-607. 2005.

Mignatti, P. e D. B. Rifkin. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. Enzyme Protein, v.49, n.1-3, p.117-37. 1996.

Mullane, K. M., R. Kraemer, *et al.* Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. J Pharmacol Methods, v.14, n.3, Nov, p.157-67. 1985.

Nakajima, Y., M. Shimazawa, *et al.* Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. Life Sci, v.80, n.4, Jan 2, p.370-7. 2007.

Nissen, N. N., P. J. Polverini, *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. Am J Pathol, v.152, n.6, Jun, p.1445-52. 1998.

Nothenberg, M. Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas. Química e Derivados, v.348, p.24-28. 1997.

Opalenik, S. R. Davidson, J. M. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. FASEB J, v.19, n.11, Sep, p.1561-3. 2005.

Orsolich, N. e I. Basic. Water-soluble derivative of propolis and its polyphenolic compounds enhance tumoricidal activity of macrophages. J Ethnopharmacol, v.102, n.1, Oct 31, p.37-45. 2005.

Park, Y. P. I., M.; Abreu, J.A.D.S.; Alcici, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.18. 1998.

Paulino, N., S. R. Abreu, *et al.* Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. Eur J Pharmacol, v.587, n.1-3, Jun 10, p.296-301. 2008.

Pereira, A. D. S. S., F.R.M.S.; Neto, F.R.A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Química Nova, v.25, p.321-326. 2002.

Peterkofsky, B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. Am J Clin Nutr, v.54, n.6 Suppl, Dec, p.1135S-1140S. 1991.

Pettersson, A., J. A. Nagy, *et al.* Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. Lab Invest, v.80, n.1, Jan, p.99-115. 2000.

Plunkett, M. L. e J. A. Hailey. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. Lab Invest, v.62, n.4, Apr, p.510-7. 1990.

Prockop, D. J., A. L. Sieron, *et al.* Procollagen N-proteinase and procollagen C-proteinase. Two unusual metalloproteinases that are essential for procollagen processing probably have important roles in development and cell signaling. Matrix Biol, v.16, n.7, Feb, p.399-408. 1998.

Rao, C. V., A. Rivenson, *et al.* Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary curcumin, a naturally occurring plant phenolic compound. Cancer Res, v.55, n.2, Jan 15, p.259-66. 1995.

Ribatti, D., A. Vacca, *et al.* Postnatal vasculogenesis. Mech Dev, v.100, n.2, Feb, p.157-63. 2001.

Riches, D. W., Chan, *et al.* Review: TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. Immunobiology, n.4, v. 195, Oct, p. 477- 490. 1996.

Roberts, A. B., B. K. Mccune, *et al.* TGF-beta: regulation of extracellular matrix. Kidney Int, v.41, n.3, Mar, p.557-9. 1992.

Roberts, A. B. e M. B. Sporn. Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). Growth Factors, v.8, n.1, p.1-9. 1993.

Rossi, A., R. Longo, *et al.* The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. Fitoterapia, v.73 Suppl 1, Nov, p.S30-7. 2002.

Ruderman, N. B., J. R. Williamson, *et al.* Glucose and diabetic vascular disease. FASEB J, v.6, n.11, Aug, p.2905-14. 1992.

Salatino, A., E. W. Teixeira, *et al.* Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Evid Based Complement Alternat Med, v.2, n.1, Mar, p.33-38. 2005.

Santos, M. A. Estudo do forrageamento de própolis em abelhas africanas, Apis mellifera 1758. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996. 59 p.

Santos, M. A. M., D. Comportamento de abelhas africanas (Apis mellifera L.) na coleta de própolis em colônias de observação em alecrim (Bacharis dracunculifolia D.C). 16º Congresso Brasileiro de Entomologia. Salvador, BA, 1997. 90 p.

Schultz, G., D. S. Rotatori, *et al.* EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. J Cell Biochem, v.45, n.4, Apr, p.346-52. 1991.

Sehn, E., L. Hernandez, *et al.* Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. Anal Chim Acta, v.635, n.1, Mar 2, p.115-20. 2009.

Serarslan, G., E. Altug, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. Clin Exp Dermatol, v.32, n.6, Nov, p.709-15. 2007.

Shimazawa, M., S. Chikamatsu, *et al.* Neuroprotection by Brazilian Green Propolis against In vitro and In vivo Ischemic Neuronal Damage. Evid Based Complement Alternat Med, v.2, n.2, Jun, p.201-207. 2005.

Simpson, D. M. e R. Ross. The neutrophilic leukocyte in wound repair a study with antineutrophil serum. J Clin Invest, v.51, n.8, Aug, p.2009-23. 1972.

Singer, A. J., Clark, R. A. Cutaneous wound healing. N Engl J Med, v.10, n. 341, Sep. p. 738-46. 1999.

Song, Y. S., E. H. Park, *et al.* Inhibition of angiogenesis by propolis. Arch Pharm Res, v.25, n.4, Aug, p.500-4. 2002.

Sud'ina, G. F., O. K. Mirzoeva, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. FEBS Lett, v.329, n.1-2, Aug 23, p.21-4. 1993.

Sylvia, C. J. The role of neutrophil apoptosis in influencing tissue repair. J Wound Care, v.12, n.1, Jan, p.13-6. 2003.

Szekanecz, Z. e A. E. Koch. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. Rheum Dis Clin North Am, v.30, n.1, Feb, p.97-114. 2004.

Teixeira, A. S., M. V. Caliari, *et al.* Aminoguanidine prevents impaired healing and deficient angiogenesis in diabetic rats. Inflammation, v.23, n.6, Dec, p.569-81. 1999.

Teixeira, E. W., G. Negri, *et al.* Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. Evid Based Complement Alternat Med, v.2, n.1, Mar, p.85-92. 2005.

Temiz, M. Aslan, A, *et al.* Effect of propolis on healing in experimental colon anastomosis in rats. Adv Ther, v. 25, n. 2, Feb, p. 159-67. 2008.

Tomás-Barberán, F. A. G.-V., C.; Vit-Oliver, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry, v.34, p.191-196. 1993.

Veale, D. J. e U. Fearon. Inhibition of angiogenic pathways in rheumatoid arthritis: potential for therapeutic targeting. Best Pract Res Clin Rheumatol, v.20, n.5, Oct, p.941-7. 2006.

Vickery, M. L. Vickery, B. V. Secondary plant metabolism: Macmillan press. 1981

Walker, P. C., E. Constituents of propolis. Apidologie, v.18, p.327-334. 1987.

Walsh, D. A., D. E. Hu, *et al.* Sequential development of angiotensin receptors and angiotensin I converting enzyme during angiogenesis in the rat subcutaneous sponge granuloma. Br J Pharmacol, v.120, n.7, Apr, p.1302-11. 1997.

Warakomsaka, Z. Maciejewicz, W. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. Apidologie, v.23, p.277-283. 1992.

Wilgus, T. A., Y. Vodovotz, *et al.* Reduction of scar formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment. Wound Repair Regen, v.11, n.1, Jan-Feb, p.25-34. 2003.

Woisky, R. G. S., A. Analysis of propolis:some parameters and procedures for chemical quality control. J Api Res, v.37, n.2, p.99-105. 1998.

Woodruff, C. W. Ascorbic acid--scurvy. Prog Food Nutr Sci, v.1, n.7-8, p.493-506. 1975.

Yates, R. A., L. B. Nanney, *et al.* Epidermal growth factor and related growth factors. Int J Dermatol, v.30, n.10, Oct, p.687-94. 1991.

Zanaboni, G., A. Rossi, *et al.* Stability and networks of hydrogen bonds of the collagen triple helical structure: influence of pH and chaotropic nature of three anions. Matrix Biol, v.19, n.6, Nov, p.511-20. 2000.

8. ANEXOS

ANEXO 1. CROMATÓGRAFO

Amostra: Sanaquoso (31458)

Equipamento: Esquire 3000 Plus Bruker Daltonics

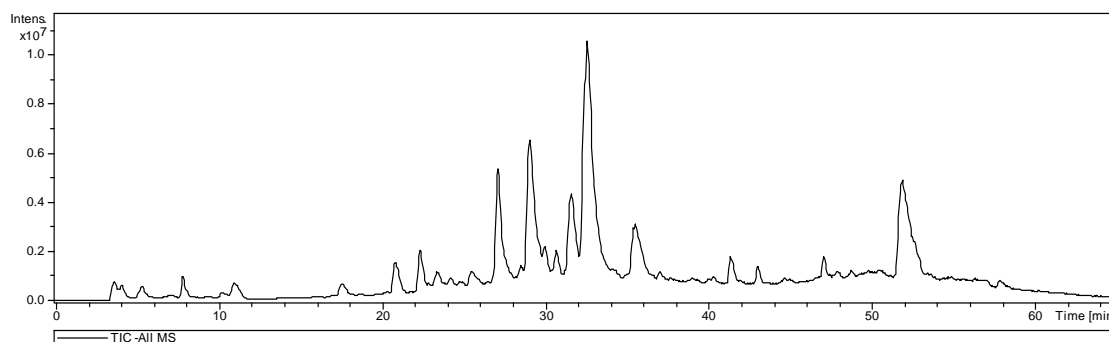
Capilaridade: 4000V

Nebulização: 27 psi

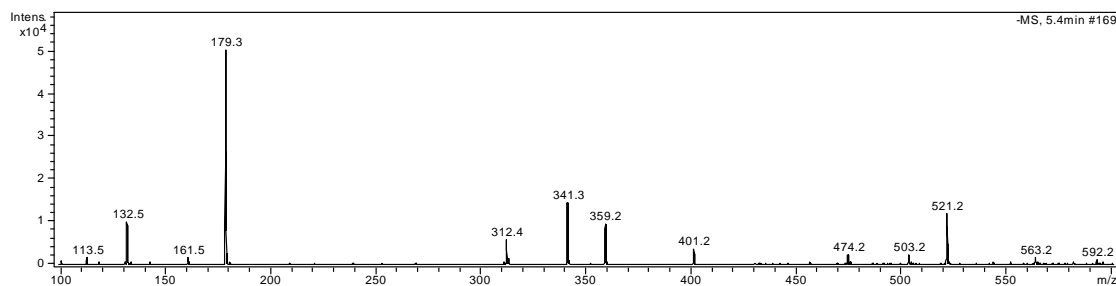
Dry Gas: 570 l/min

Dry Temp: 300C

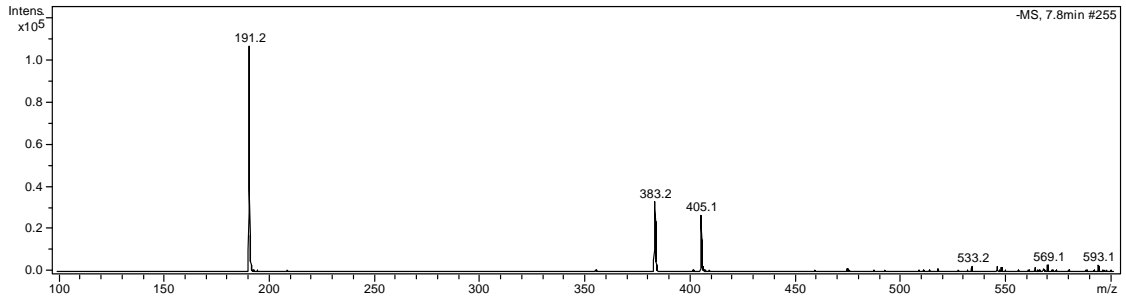
Fluxo para massa de 90uL/min



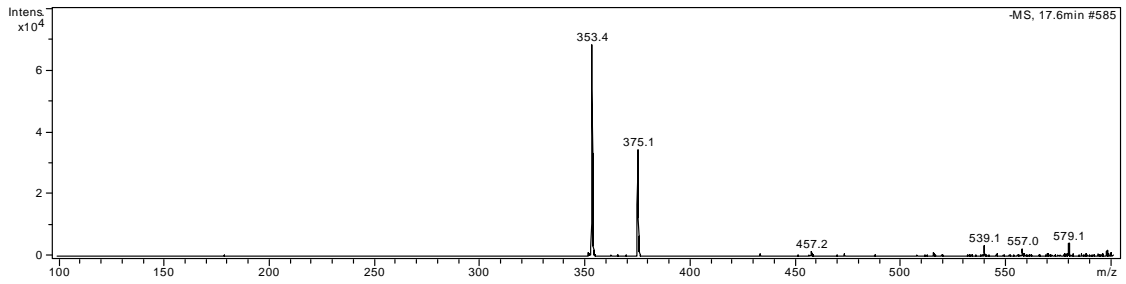
Cromatograma obtido no modo iônico negativo do extrato aquoso da própolis verde.



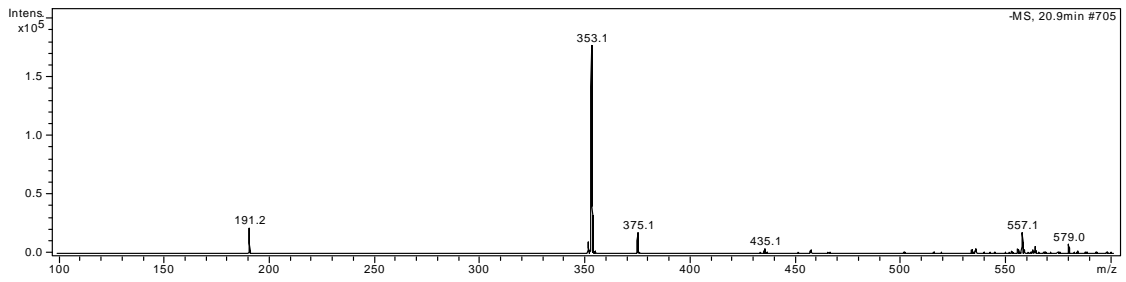
ESI/MS do ácido caféico no modo negativo



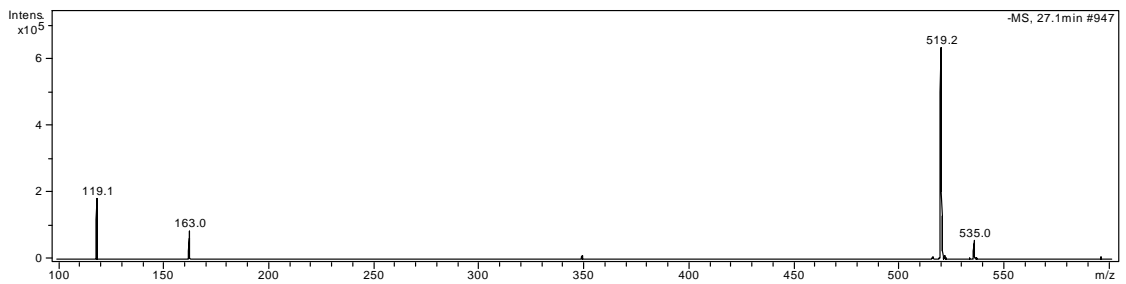
ESI/MS do ácido quínico no modo negativo



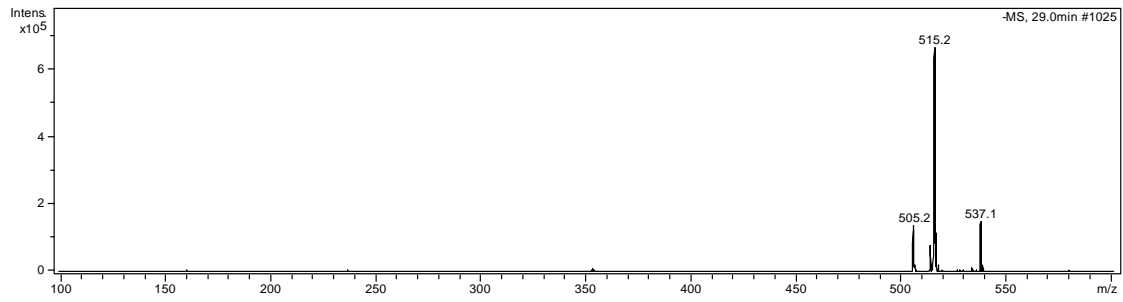
ESI/MS do 5-O-(E)-ácido cafeoilquínico no modo negativo



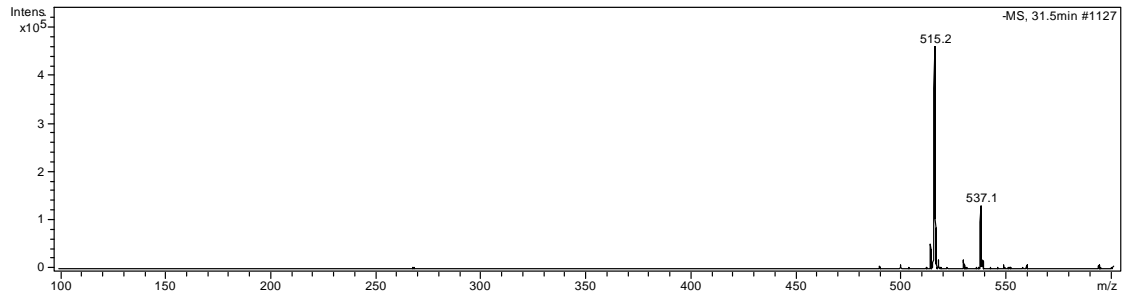
ESI/MS do 4-O-(E)-ácido cafeoilquínico no modo negativo



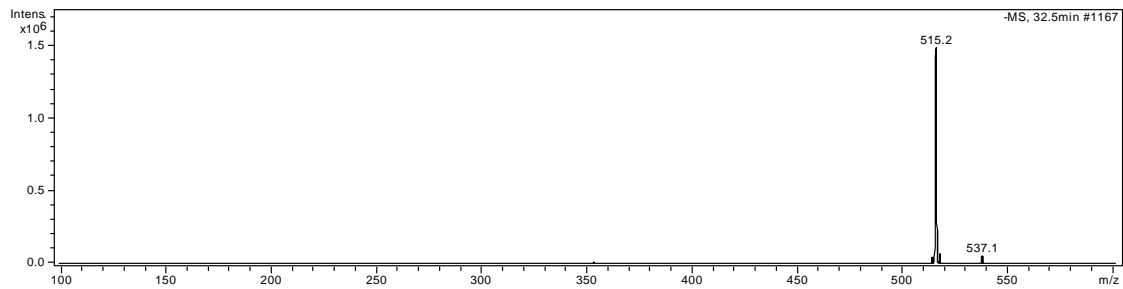
ESI/MS do ácido dihidrocafeoilquínico no modo negativo



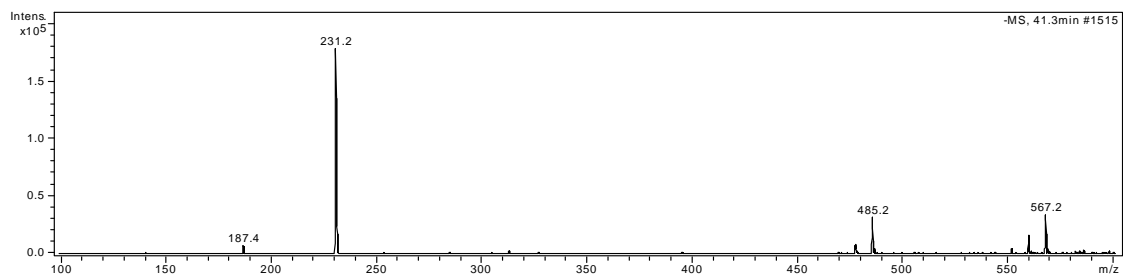
ESI/MS do 3,4-di-O-(E)-ácido caffeoilquinico no modo in negativo



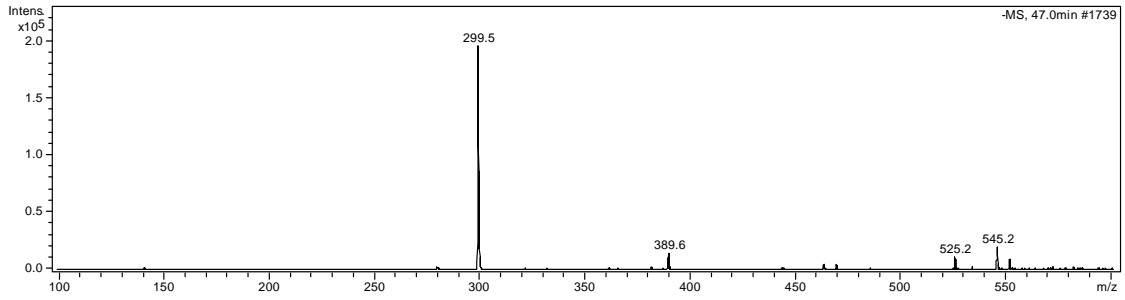
ESI/MS do 3,5-di-O-(E)-ácido caffeoilquinico no modo negativo



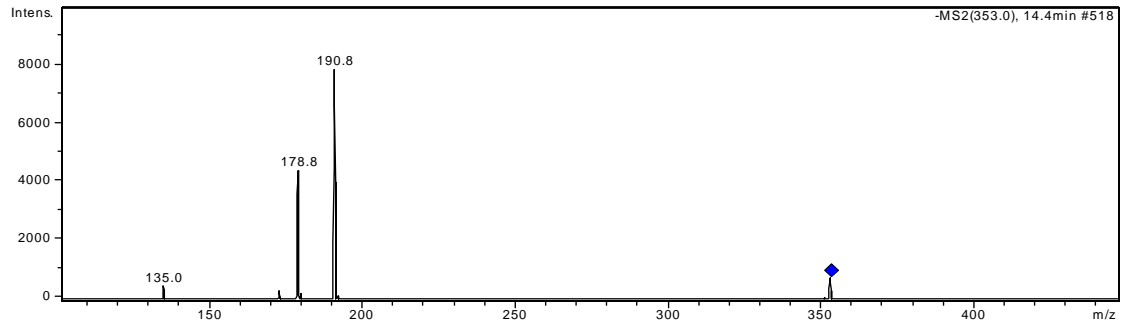
ESI/MS do 4,5-di-O-(E)-ácido caffeoilquinico no modo negativo



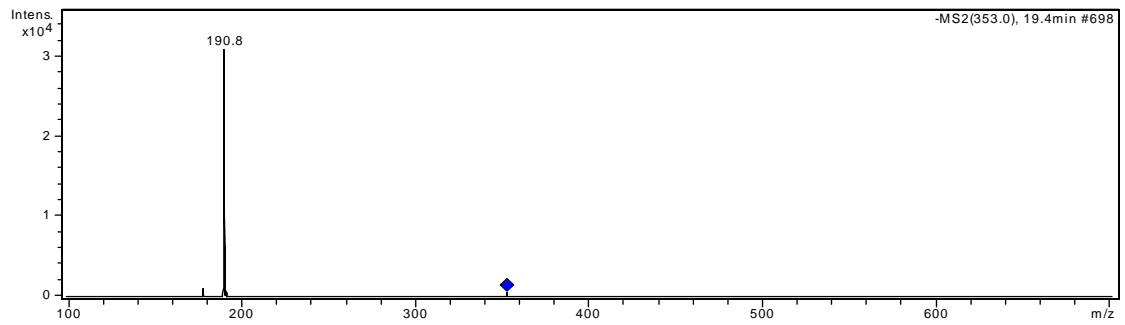
ESI/MS do 4-hidroxi-3-ácido-prenil-cinâmico (drupanin) no modo negativo



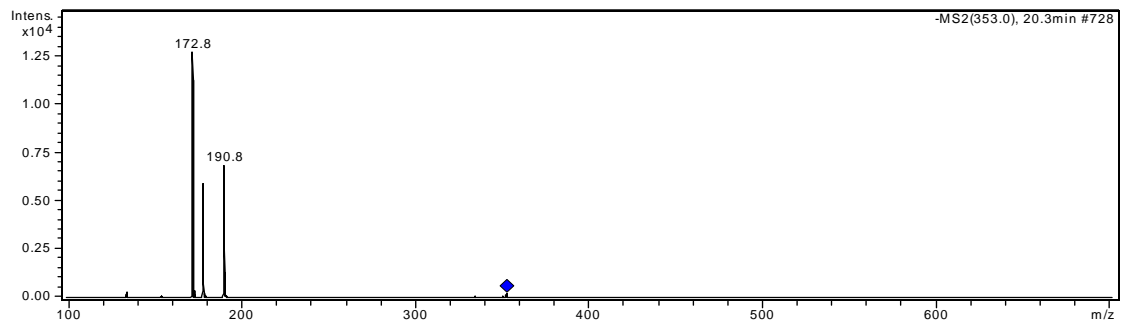
ESI/MS do 4-hidroxi-3,5-diprenil-ácido cinâmico (artepillina C) no modo negativo



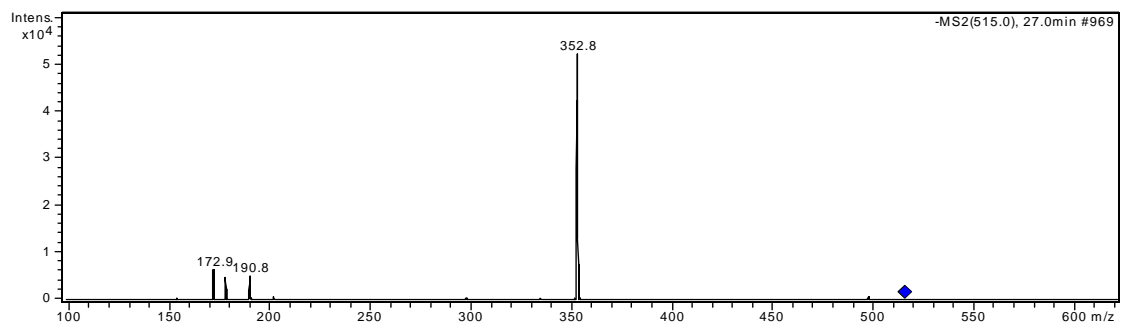
ESI/MS/MS do 3-O-(E)-ácido caffeoilquinico no modo negativo



ESI/MS/MS do 5-O-(E)-ácido caffeoilquinico no modo negativo



ESI/MS/MS do 4-O-(E)-ácido caffeoilquinico no modo negativo



ESI/MS/MS do 4,5-di-O-(E)-ácido cafeoilquinico no modo negativo

ANEXO 2. PROTOCOLO CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 161/2005**, relativo ao projeto intitulado "**Avaliação dos efeitos do ácido caféico presente nos extratos de própolis verde na inflamação e angiogênese induzidas em implantes de esponja**", que tem como responsável **Denise Carmona Cara Machado**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **5/04/2006**.

Este certificado expira-se em **5/04/2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 161/2005**, related to the project entitled "**Evaluation of cafeic acid derived from green propolis on inflammation and angiogenesis in a sponge implant model**", under the supervision of **Denise Carmona Cara Machado**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 5, 2006**.

This certificate expires in **April 5, 2011**.

Belo Horizonte, 5 de Abril de 2006.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG


Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/prpq/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

ANEXO 3. 1º ARTIGO CIENTÍFICO (COMPROVANTES ENVIO)

Manuscript Central Página 1 de 1

 Evidence Based
Complementary and
Alternative Medicine [Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#) 

You are logged in as **Silvia Andrade**

Submission Confirmation


Thank you for submitting your manuscript to *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.

Manuscript ID: ECAM-08-0448

Title: Aqueous extract of Brazilian propolis: main constituents and evaluation of effects in the inflammation and wound healing processes by use of subcutaneous implanted sponges


Authors: Moura, Sandra L
Negri, Giuseppina
Salatino, Antonio
Lima, Luiza D C
Dourado, Luana P A
Ferreira, Monica A N D
Andrade, Silvia
Cara, Denise C
Mendes, Juliana B


Date Submitted: 04-Dec-2008

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

Manuscript Central™ v4.11 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2008. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Manuscript Central Página 1 de 1

 Evidence Based
Complementary and
Alternative Medicine [Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → [Submission Confirmation](#) 

You are logged in as **Silvia Andrade**

Submission Confirmation



Thank you for submitting your revised manuscript to *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*.

Manuscript ID: ECAM-08-0448.R1

Title: Aqueous extract of Brazilian green propolis: main constituents and evaluation of effects in the inflammation and wound healing processes by use of subcutaneous implanted sponges

Authors: Moura, Sandra L
Negri, Giuseppina
Salatino, Antonio
Lima, Luiza D C
Dourado, Luana P A
Mendes, Juliana B
Andrade, Silvia
Ferreira, Monica A N D
Cara, Denise C

Date Submitted: 12-Mar-2009

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

Manuscript Central™ v4.1.2 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

ANEXO 4. 2ºARTIGO CIENTÍFICO (COMPROVANTE DE ENVIO)

ANEXO 5. 3º ARTIGO CIENTÍFICO (ACEITO)

ESTUDO DO TEOR DE FLAVONÓIDES EM DIFERENTES EXTRATOS DA PRÓPOLIS VERDE PRODUZIDA NO MUNICÍPIO JAGUARAÇU – MG

Analina Furtado Valadão.

Professora do Curso de Farmácia - Unileste-MG.

Doutora em Bioquímica e Imunologia – UFMG.

Leonardo Ramos Paes Leme.

Professor do Curso de Farmácia - Unileste-MG.

Doutor em Bioquímica Agrícola. – UFV.

Sandra Aparecida Lima de Moura.

Professora do Curso de Farmácia - Unileste-MG.

Mestre em Medicina Veterinária – UFV.

Juliermy Rabello Cota Senna.

Graduando do Curso de Farmácia - Unileste-MG.

RESUMO

A própolis é uma substância produzida pelas abelhas a partir de ceras e resinas coletadas de diversas partes das plantas com o objetivo de forrar os alvéolos e vedar as entradas e orifícios da colméia. Possui propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, hipotensiva, anestésica, anticariogênica, dentre outras, e essas atividades estão diretamente ligadas a sua composição química. Entre as substâncias isoladas, preponderam os flavonóides como um dos principais responsáveis pelas propriedades farmacológicas observadas na própolis, pois eles possuem ação antioxidante, minimizando o efeito dos radicais livres. Visando obter extratos da própolis com elevados teores de flavonóides foi realizado um experimento utilizando diferentes solventes em diferentes concentrações, além da mistura de alguns solventes. Os extratos foram preparados e a concentração de flavonóides foi avaliada por absorvância no espectrofotômetro a 425 nm utilizando cloreto de alumínio a 5% em metanol. A concentração foi determinada a partir de uma reta padrão feita com soluções de quercetina, um tipo de flavonóide. Após as leituras das absorvâncias, constatou-se que o extrato etanólico a 70% foi o que apresentou os melhores resultados em todos os testes realizados, sendo considerado o melhor solvente e a melhor concentração para a preparação dos extratos.

Palavras-chave: Própolis, flavonóides, absorvância, extrato etanólico 70%.

ABSTRACT

The propolis are the substance produced for the bees from waxes and collected resins of diverse parts of the plants with the objective to line the alveoli and to forbid the entrances and orifices of the beehive. It possess therapeutical properties, as anti-microbial, anti-inflammatory, hypotensive, anesthetic, anti-tumoral activity, amongst others, and these activities are directly on its chemical composition. Between isolated substances, they preponder the flavonoids as ones of main the responsible ones for the observed pharmacological properties in the propolis, therefore they possess anti-oxidant action, minimizing the effect of the free radicals. Aiming at to get extracts of the propolis with raised texts of different flavonoids an experiment was carried through using solvent in different concentrations, beyond the mixture of some solvents. The extracts had been prepared and the concentration of flavonoids was evaluated by spectrophotometric determination in the 425 nm having used aluminum chloride 5% in methanol. The concentration was determined from a straight line standard made with quercetin solutions, a

PRINCIPIUM ONLINE: Iniciação Científica no Unileste-MG, Coronel Fabriciano, v. 1, n. 3, p.51-58, dez. 2007.
