

NIRALDO PAULINO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO
PADRONIZADO DE PRÓPOLIS P1 E DE SEU PRINCIPAL
CONSTITUINTE ATIVO, ARTEPILLIN C ®**

Florianópolis, 2005.

NIRALDO PAULINO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO
PADRONIZADO DE PRÓPOLIS P1 E DE SEU PRINCIPAL
CONSTITUINTE ATIVO, ARTEPILLIN C ®**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Prof. João Batista Calixto.

Florianópolis, 2005.

O entusiasmo é a maior força da alma.
CONSERVA-O...e nunca te faltará poder para
consequires o que desejas.

Napoleon Hill

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto, que foi orientador e amigo e onde encontrei um caminho seguro a seguir.

A todos os professores do departamento de Farmacologia da UFSC que se mostraram sempre presentes quando solicitados.

À Professora Maria Cristina Marcucci, amiga e colaboradora de longa data na pesquisa com própolis.

Aos Professores da Ludwig Maximilian Universität München (Alemanha), em especial à Professora Angelika Vollmar e Verena Dirsch.

Ao Prof. Hori e Prof. Uto da Tokushima University pelo fornecimento do Artepillin C em grande escala para os ensaios desta tese.

A Analytical Solution Consultoria em Meio Ambiente e a Farmacêutica Juliana Catto

A todos os colegas do curso de pós-graduação que foram muito mais que colegas de laboratório.

À Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) que apoiou a iniciativa de meu doutoramento e me deu apoio incondicional em todos os momentos.

Ao sistema ACADEMIA/CAPES pelo apoio financeiro.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte ou contribuíram de alguma forma para esta tese de doutorado.

RESUMO

A própolis é uma resina natural produzida pelas abelhas e utilizada, popularmente, para o tratamento de inúmeras doenças, entre elas os processos inflamatórios. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar, através de estudos *in vitro* e *in vivo*, usando técnicas farmacológicas e bioquímicas, a atividade antiinflamatória da própolis padronizada do sul do Brasil (P1) e de seu principal constituinte, Artepillin C. Ressalta-se também a investigação sobre a farmacocinética de absorção desse constituinte após a ingestão oral de própolis P1. Foram utilizados diversos modelos farmacológicos de inflamação *in vivo*: edema de pata, peritonite e prostaglandina E₂ (PGE₂) no lavado peritoneal, avaliação da atividade da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em cultura de células do endotélio vascular (EA.HY926), determinação da produção de óxido nítrico em cultura de células de macrófagos murinos (RAW 264.7) estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS); avaliação da expressão e atividade da p38-MAPK em cultura primária de músculo liso vascular aórtico de rato (VSM) na presença de angiotensina II; avaliação da atividade específica do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) em células de rim embrionário humano (HEK 293) transfectadas como gene de expressão do NFκB, estimuladas com fator de necrose tumoral alfa (TNFα). Além disso, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de Artepillin C em camundongos tratados com própolis ou Artepillin C em vários intervalos de tempo para a determinação de biodisponibilidade oral desse constituinte através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e de cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG massa). Nossos resultados demonstraram que a própolis ou Artepillin C possuem efeito antiedematogênico, antiinflamatório reduzem a produção de PGE₂ no lavado peritoneal, mas não afetam a expressão da enzima eNOS ou ainda, a sua atividade. No entanto, eles inibem a ativação de RAW 264.7 e a conseqüente produção de NO, diminuindo assim a ativação do sistema da p38-MAPK em músculo liso vascular e inibem a ativação do NFκB. Além disso, os resultados demonstraram que concentrações efetivas de Artepillin C são encontradas no plasma após a ingestão oral de própolis P1 e de Artepillin C, com pico de concentração máxima entre 1 e 2 h quando analisados em HPLC e CG-massa. Analisados em conjunto, esses dados indicam que a própolis P1 e seu principal constituinte ativo, Artepillin C, possuem efeito antiedematogênico e antiinflamatório que podem estar, pelo menos em parte, envolvidos com a inibição da produção de PGE₂, pela inibição da atividade de macrófagos e conseqüente redução da produção de NO durante o processo inflamatório, pelo aumento da resistência vascular mediada através da ativação do

sistema p38-MAPK e pela inibição do NF κ B. Esses resultados justificam o uso popular da própolis como anti-inflamatório e demonstram, pela primeira vez, que o Artepillin C pode ser considerado um biomarcador importante para o controle químico e biológico da qualidade da resina de própolis no Brasil.

ABSTRACT

Propolis is a natural products produced by bees and used widely to treat several diseases in folk medicine. This study was designed to investigate the anti-inflammatory effect of extract of Brazilian propolis (P1) and Artepillin C (Art C) by mean of several *in vitro* and *in vivo* methods, and pharmacological and biochemical assays. We used male Swiss mice treated with P1 or Art C before inflammation with carrageenin on paw oedema, peritonitis or pleurisy. We evaluated the PGE₂ on peritoneal exudates, eNOS activity from vascular endothelial cells (EA.HY 928), NO production in RAW 264.7, expression of p-38-MAPK in vascular smooth muscle cells (VSM) and activity of NFκB in HEK293. Finally, we evaluated the plasmatic concentration of Art C by mean HPLC and CG-mass after oral administration of P1 or Art C. P1 or Art C produced a maximal inhibition of 46±4% in 240 min or 50±6% in 60 min, respectively, in the paw oedema. P1 or Art C inhibited leukocyte migration with IC₅₀ means 53 (48-57) mg/Kg or 0.9 (0.6-1.1) mg/Kg, respectively. MPO confirm the presence of neutrophils on peritoneal exudate. P1 (10, 30 or 100mg/Kg) or Art C (3 or 10 mg/Kg) reduced the PGE₂ 30±2, 62±3, 83±2% or 41±3, 66±4%, respectively. P1 or Art C did not produce change on eNOS. In RAW 264.7 the incubation with P1 or Art C reduced the NO production with IC₅₀ 52±51 (45-74) μg/mL or 6.8 (5.7-7.4) μM. P1 (10, 30 or 300 μg/mL) increased p-38-MAPK 28±3, 107±6 or 147±7%, respectively in VSM. In HEK293, P1 or Art C reduced the activity of NFκB with IC₅₀ 43 (40-46) μg/mL or 89 (77-98) μM, respectively. After P1 (100mg/Kg, p.o.) was found on blood the maximal concentration of 7.1 μg/mL after 2h and to Art C (10mg/Kg) was found 22 μg/mL after 1h. Take together, our results show P1 and Art C modulate the paw and peritoneal inflammation, PGE₂ and the NO production. These effects can be related with p-38-MAPK and NFκB pathway. We have shown also that Art C is a biomarker to evaluate the quality of Brazilian propolis samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Característica da produção de própolis na Europa.	22
Figura 2: Característica vegetal da região para a produção de própolis no Brasil.	23
Figura 3: Principais classes de compostos presentes na própolis.	26
Figura 4: Espécies de plantas com função propolinizadora no sul e sudeste brasileiro.....	29
Figura 5: Perfil cromatográfico por HPLC da própolis P1.....	30
Figura 6: Produção nacional de própolis e as características da própolis produzida que varia do marrom, mais ao sul, até o verde intenso, na região do triangulo mineiro.....	37

Figura 7: Efeito do tratamento com salina, própolis P1 10, 100 mg/kg ou indometacina 10 mg/Kg, via oral, sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (Cg, 300 µg/pata)..... 63

Figura 8: Efeito do tratamento com salina, dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) ou própolis P1 10, 30 ou 100mg/kg, via oral (A) ou 1, 3 ou 10mg/kg, via i.p. (B), sobre o total de células presentes no lavado peritoneal dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 µg/mL/cavidade). 66

Figura 9: Efeito do tratamento com salina, dexametasona (0,5 mg/kg s.c) ou Artepillin C (0,1, 1 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre o total de células presentes no lavado peritoneal dos animais tratados com carragenina (cg, 100 µg/ml/cavidade)..... 67

Figura 10: Efeito do tratamento com salina, dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) ou própolis P1 (10, 30 ou 100mg/kg, via oral ou 1, 3 ou 10 mg/Kg, i.p.) sobre o total de células presentes no lavado pleural dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 µg/ml/cavidade). 69

Figura 11: Efeito do tratamento com salina, dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) ou Artepillin C (0,1, 1 ou 10mg/kg, via i.p.) sobre o total de células presentes no lavado pleural dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 µg/mL/cavidade)..... 70

Figura 12: Efeito do pré-tratamento com salina ou propolis P1 (1, 10 ou 100 mg/Kg, v.o), ou Artepillin C (0,1, 1 ou 10mg/kg, via i.p.) sobre o aumento dos níveis de PGE₂ no lavado peritoneal dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 µg/mL/cavidade).....71

Figura 13: Efeito da incubação de própolis P1 ou forbol miristato acetato sobre a atividade ou expressão da eNOS em células endoteliais (EA.hy926) por 18 horas. (A) Western blot para a detecção de eNOS e proteína GAPDH. (B) Células Ea.hy926 foram estimulados com concentrações crescentes de própolis P1 (100, 300 ou 500 µg/mL) ou PMA 2nmol/L) por 18 horas.....72

Figura 14: Efeito do tratamento com veículo (LPS1), própolis P1 (10, 30 ou 100 µg/ml) ou Artepillin C (1, 3, 10 ou 100 µM) sobre o acúmulo de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) por 20 horas.74

Figura 15: Efeito do tratamento com veículo (LPS1), própolis P1 (10, 30 ou 100 µg/ml) ou Artepillin C (1, 3, 10 ou 100 µM) sobre a viabilidade celular das células RAW 264.7 após a incubação do extrato de própolis P1 ou compostos e estimulados com LPS (1 µg/mL) por 20 horas.75

Figura 16: Figura 13: Efeito da incubação de própolis P1 (30, 100 ou 300 µg/mL) ou angiotensina II (100 nM) sobre a expressão da p-38 MAPK em cultura primária de células musculares lisas vasculares de aorta de rato. Ao lado, Western blot para a detecção de p38 MAPK.....76

Figura 17: Efeito do tratamento com $\text{TNF}\alpha$ ou $\text{TNF}\alpha$ + extrato de própolis P1 (10, 30 ou 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou MG132 (10 μM) sobre a atividade do $\text{NF}\kappa\text{B}$ em células de rim embrionário humano (HEK293)..... 77

Figura 18: Curso temporal de absorção do Artepillin C pela via oral após administração de própolis P (100 mg/Kg) ou solução de Artepillin C (10 mg/Kg). Os resultados representam os picos de concentração plasmática de Artepillin C após o tratamento nos vários intervalos de tempo. 79

Figura 19: O *TIC* do padrão de Artepillin C com concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 80

Figura 20: Espectro de massas do pico majoritário do padrão analisado. 80

Figura 21: O *TIC* da solução de concentração 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ submetida a reação com BSTFA. 81

Figura 22: Curso temporal de absorção do Artepillin C pela via oral após administração de própolis P (100 mg/Kg) ou solução de Artepillin C (10 mg/Kg). Os resultados representam os picos de concentração plasmática de Artepillin C após o tratamento nos vários intervalos de tempo analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa (CG massa) 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estruturas químicas dos principais compostos identificados na própolis Brasileira.....	31
Tabela 2: Principais constituintes químicos presentes na amostra de extrato de própolis P1 e seus respectivos rendimentos.	32
TABELA 3: Percentuais de inibição obtidos para o extrato de própolis e artepillin c ou indometacina no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AT1: Receptor de angiotensina 1

BSTFA: N,N-bis-(trimetilsilil)-trifluoracetamida

CAPE: Éster do ácido cafeico – éster feniletil cafeato

CAT: Cloranfenicol acetiltransferase

Cg: Carragenina

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Composto B: Ácido 3-prenil-4-hidroxixinâmico

Composto C: 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano

Composto D: Artepillin C ®, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico

Composto G2: 3-metoxi-4-hidroxicinamilaldeído

Composto I: 2-[1-hidroximetil] vinil-6-acetil-5-hidroxicumarano

Composto L2: 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano

COX₂: Enzima ciclooxigenase tipo 2

DAAD: Deutscher Akademischer Austauschdienst

DMSO: Dimetilsulfóxido

EA.hy 926: Linhagem de células modificadas do endotélio vascular de aorta de rato.

eNOS: Enzima óxido nítrico sintase endotelial

FBS: Soro fetal bovino

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GFP: Proteína verde de fluorescência

HEK 293: Linhagem celular de rim embrionário humano

I κ B: Proteína inibidora do fator de transcrição nuclear kappa B

L-NOArg: L-nitro arginina

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio)

NANC: Inervação não-adrenérgica não-colinérgica

NF κ B: Fator de transcrição nuclear kappa B

NMR: Ressonância magnética nuclear

NOS: Enzima óxido nítrico sintase

P1: Extrato padronizado de própolis do sul do Brasil

PBS: Solução tampão fosfato

PGE₂: Prostaglandina E₂

PGF_{2 α} : Prostaglanida F₂ alfa

PMA: Éster de forbol – forbol miristato acetato.

p-NF κ B Luc: Plasmídeo para o fator de transcrição nuclear kappa B marcado para o ensaio da luciferase

RAW264.7: Linhagem de células de macrófagos murinos

SKCa: Canais de potássio de baixa condutância modulados por cálcio.

TIC: Total Ion Chromatogram

TMS: Tetrametilsilano

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos históricos da própolis	18
1.2 Características organolépticas	23
1.3 Composição química	25
1.4 Utilização industrial da própolis	33
1.5 Propriedades biológicas	37
2 OBJETIVOS	43
2.1 Geral	43
2.2 Específicos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Própolis	45
3.1.1 Preparo do extrato padronizado	45
3.1.2 Avaliação cromatográfica, isolamento e identificação química dos compostos majoritários presentes na própolis P1	46
3.2 Avaliação da atividade antiinflamatória	46
3.2.1 Animais	46

3.2.2 Edema de pata	47
3.2.3 Peritonite em camundongos.....	47
3.2.4 Pleurisia em camundongos	48
3.2.5 Determinação dos níveis de prostaglandina E ₂ no lavado peritoneal.....	49
3.2.6 Atividade sobre a enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS)	50
3.2.7 Produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7).....	51
3.2.8 Viabilidade celular (MTT).....	53
3.2.9 Atividade p38-MAPK em cultura primária de célula muscular lisa vascular (VSMC)	53
3.2.10 Atividade específica do NFκB (ensaio da luciferase)	55
3.3 Avaliação farmacocinética da própolis e do composto Artepillin C.....	57
3.3.1 Protocolo de tratamento	57
3.3.2 Avaliação cromatográfica dos níveis de Artepillin C no soro dos animais por HPLC.....	58
3.3.3 Avaliação cromatográfica dos níveis de Artepillin C no soro dos animais por CG-Mass	59
3.4 Drogas e reagentes	60
3.5 Análise Estatística.....	61
4 RESULTADOS.....	62
4.1 Avaliação da atividade antiinflamatória	62
4.1.1 Efeito do extrato de própolis P1 e Artepillin C sobre o edema de pata induzido por carragenina	62
4.1.2 Efeito do extrato de própolis P1 (v.o) e do Artepillin C sobre a peritonite induzida por carragenina	64

4.1.3 Efeito do extrato de própolis P1 (v.o) ou (i.p.) ou Artepillin C (i.p) sobre a pleurisia induzida por carragenina	67
4.1.4 Efeito da Própolis P1 e do Artepillin C nos níveis de Prostaglandina E ₂ do lavado peritoneal	70
4.1.5 Efeito da própolis p1 sobre a produção de óxido nítrico em células endoteliais vasculares humanas (EA.HY926)	72
4.1.6 Efeito da própolis P1 e do Artepillin C sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7)	73
4.1.7 Efeito do extrato de própolis P1 sobre a atividade da p-38 MAPK em células de músculo liso vascular	75
4.1.8 Efeito da própolis e do Artepillin C sobre a atividade do NFκB (Ensaio da Luciferase).....	76
4.2 Avaliação da biodisponibilidade do Artepillin C	78
5 DISCUSSÃO	83
6 SUMÁRIO	99
7 CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS.....	102
ANEXOS	130
ANEXO 1 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM AMOSTRAS DE PORÓPOLIS NO MUNDO	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos da própolis

As abelhas habitam nosso planeta há pelo menos 60 milhões de anos, e sua história demonstra quão útil elas têm sido para a natureza e para o homem. Seu importante papel na polinização garante a frutificação e as sementes, que por sua vez, dão alimento e vida ao reino animal. Os produtos elaborados por elas são para o homem o verdadeiro presente da natureza, o “elixir da longa vida” (POTZELN, 1985), e, dentre os diversos produtos apícolas, a própolis tem encontrado grande destaque.

Própolis ou cola de abelha é uma complexa mistura de metabólitos secundários e tem sido largamente usada em muitos países para o tratamento de diversas doenças (GHISALBERT et al,1979). O nome própolis é derivado do grego *pro*, em defesa de, e *polis*, a cidade, o que significa “em defesa da cidade ou da colméia” (MARCUCCI, 1996a). O escritor francês Dr. Yves Donadieu define a própolis como “uma série de substâncias resinosas e balsâmicas, de consistências viscosas, recolhidas de certas partes de vegetais, substâncias estas que as abelhas levam para a colméia e acrescentam certos reagentes pela adição de suas próprias

secreções (ceras e secreções salivais), modificando-as parcialmente e transformando-as para tornar a própolis adequada e perfeitamente aplicável as suas múltiplas finalidades”.

As abelhas utilizam a própolis para a construção e manutenção das colméias (BURDOCK, 1998). Utilizam-na para fechar frestas, reduzindo assim a entrada do vento, do frio e, principalmente, dos inimigos naturais, além de utilizá-la para embalsamar pequenos animais mortos pelas abelhas, que não puderam ser retirados da colméia, evitando com isso a putrefação (DEBUYSER, 1983). A própolis também é utilizada como material de construção no interior da colméia, soldando favos, quadros e envernizando o interior dos alvéolos para que a rainha faça a postura dos ovos em um ambiente não contaminado (GOJMERAC, 1980).

Da própria definição já se conclui que a própolis tem dupla origem, uma de procedência externa pela coleta de materiais vegetais, e outra de procedência interna ou fisiológica pela adição de secreções glandulares. Portanto, existem duas teorias sobre a procedência da própolis elaborada pelas abelhas; uma delas é a “Teoria da Origem Interna ou Endógena”, apresentada em 1907 pelos cientistas alemães Kustenmacher, Philip, Weck e outros. Esses autores defendem a idéia de que a própolis é um produto da digestão do pólen pelas abelhas, já que, em sua análise, são encontrados bálsamos e óleos das membranas dos pólenes. Essa teoria é a menos aceita, pois na composição da própolis deveriam estar presentes substâncias nitrogenadas, açúcares e lipídios encontrados no pólen. Além disso, os flavanóides encontrados estão na forma livre (agliconas) e não na forma de glicosídeos como são geralmente encontradas nos vegetais, comprovando assim o efeito das glândulas salivares das abelhas sobre os glicosídeos das plantas (VERRÍSSIMO, 1980).

A outra teoria chama-se "Teoria da Origem Externa ou Exógena", segundo essa teoria, apresentada por Rosch, Evenus, Berlepsch e outros, as abelhas retiram a resina da casca de certos vegetais como as gimnospermas (coníferas, pinheiros, araucárias) ou ainda de brotos e gemas de angiospermas (abacateiro, ameixeiras, eucalipto, vassoura e outras) e através do ácido 10-hidroxidocenóico e enzimas presentes nas suas secreções mandibulares, acrescentam pólen e ceras, que, compactados, formam uma pasta resinosa. Essa teoria é a mais aceita, pois já se observou que em lugares onde há muito pólen e poucas árvores, as abelhas praticamente não produzem própolis (VERRÍSSIMO, 1980).

Esses fatos já vêm sendo estudados desde o primeiro século depois de Cristo, onde a origem da própolis foi objeto de controvérsias entre sábios romanos, Plínio e Doiscorides, médicos e botânicos gregos. O primeiro defendia que as abelhas recolhiam a própolis nos rebentos dos salgueiros e dos castanheiros, enquanto o segundo atribuía a sua origem à casca do estorque, árvore balsâmica com acentuado odor de benjoin (ácido benzóico) (AGOSTINHO, 1998).

Desde antes de Cristo, a própolis era utilizada pelos sacerdotes da Medicina, da Química e da arte de mumificar os cadáveres. A Bíblia faz menção à própolis, porém com a denominação de bálsamo, como era designada pelo patriarca Jacob. Ressalta-se também que os vapores balsâmicos das resinas de própolis foram, através dos séculos, utilizados nos incensos de purificação dos mosteiros. Na antiga Assíria, a própolis em pó foi usada no tratamento de infecções e intumescências, ao mesmo tempo em que deve ter sido usada para acelerar o crescimento dos cabelos. Mais tarde, Aristóteles (384-332 a.C.) estudou o comportamento das abelhas na colmeia e designou-a por "lágrima de árvores", atribuindo-lhe eficácia no combate a chagas, feridas e dermatoses. Aristóteles, em

seu livro “Catálogo animal”, registrou a própolis como medicamento para tratamento de abscessos e feridas, ou seja, usado para prevenção das infecções (GHISALBERTI et al, 1979).

No início do século I da nossa era, médicos gregos relataram as propriedades da própolis em extrair farpas e tudo que tiver penetrado na pele, reduzir inchaço, amolecer tecido endurecido, diminuir as nevralgias, curar úlceras e abscessos (PAMPLONA, 1997).

No século XI, o médico e filósofo Avicenna escreveu que a própolis tem propriedades de diluir, limpar e amolecer intensamente os tecidos (PAMPLONA, 1997). Nos séculos XII a XV, a Medicina Empírica Geórgica utilizava a própolis nas inflamações da boca, cárie dentária, resfriados e furúnculos (AGOSTINHO, 1998). Na Medicina Empírica, a própolis é muito utilizada para o tratamento dos tumores malignos, das calosidades e das feridas (IOIRICH, 1981). Na Holanda, em meados do século XIII, eram vendidos comprimidos da própolis para aliviar a dor e para infecções por picadas de insetos.

A partir dos séculos XVII e XIX a própolis foi empregada, ocasionalmente, na França no tratamento de feridas (PAMPLONA, 1997). E, em 1900, na Guerra dos Bôeres na África do Sul, a própolis foi largamente utilizada por sua alta eficácia como desinfetante e cicatrizante (MARCUCCI, 1995). Na antiga Tchecoslováquia, usou-se a própolis como antiinflamatório, anestésico local e para regeneração de feridas em casos de otite externa, otite média, ruptura da membrana do tímpano, estomatite ulcerosa, afta, faringite crônica, rinite crônica, amigdalite, bronquite e asma brônquica, obtendo-se resultados satisfatórios em todos estes casos. Enquanto isso, em nosso continente, os incas, por volta de 1600 d.C., já utilizavam a própolis como remédio eficiente contra inflamações e febre (BREYER, 1991).

Já em nossa era, 1971, no Iraque, a própolis foi utilizada no tratamento de milhares de pessoas intoxicadas com mercúrio (POTZELN, 1985).

Atualmente, a própolis está sendo utilizada nas clínicas odontológicas com a finalidade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante (AGA et al, 1994; CAMPOS et al, 1998; DAMIAN et al, 1999; IKENO et al, 1991; KUJUMGIEV et al, 1999; MARCUCCI et al, 1995; MENEZES et al, 1999; METZNER et al, 1979; PAINTZ, 1979; PAULINO et al, 1996; SAKAMOTO et al, 1994; SCHELLER et al, 1977; SCHELLER et al, 1998; SCHIMIDT, 1996; STEIBERG et al, 1996). Na clínica médica no tratamento adjuvante das principais complicações decorrentes do tratamento de câncer como: mucosites, radiodermites e feridas de cirurgias assépticas (GONZÁLEZ, 1999). Na cirurgia plástica os resultados obtidos superaram as expectativas em relação à granulação e cicatrização de feridas, bem como a melhora de feridas infectadas (MUJALLI, 1999).

É atualmente bem aceito na literatura que a própolis Européia e de outros países de clima temperado (Figura 1) é quimicamente diferente da própolis de países de clima tropical.



Figura 1: Característica da produção de própolis na Europa.

No Brasil a própolis é produzida a partir de espécies vegetais distintas daquelas encontradas na Europa, conferindo características diferentes a nossa própolis (Figura 2).

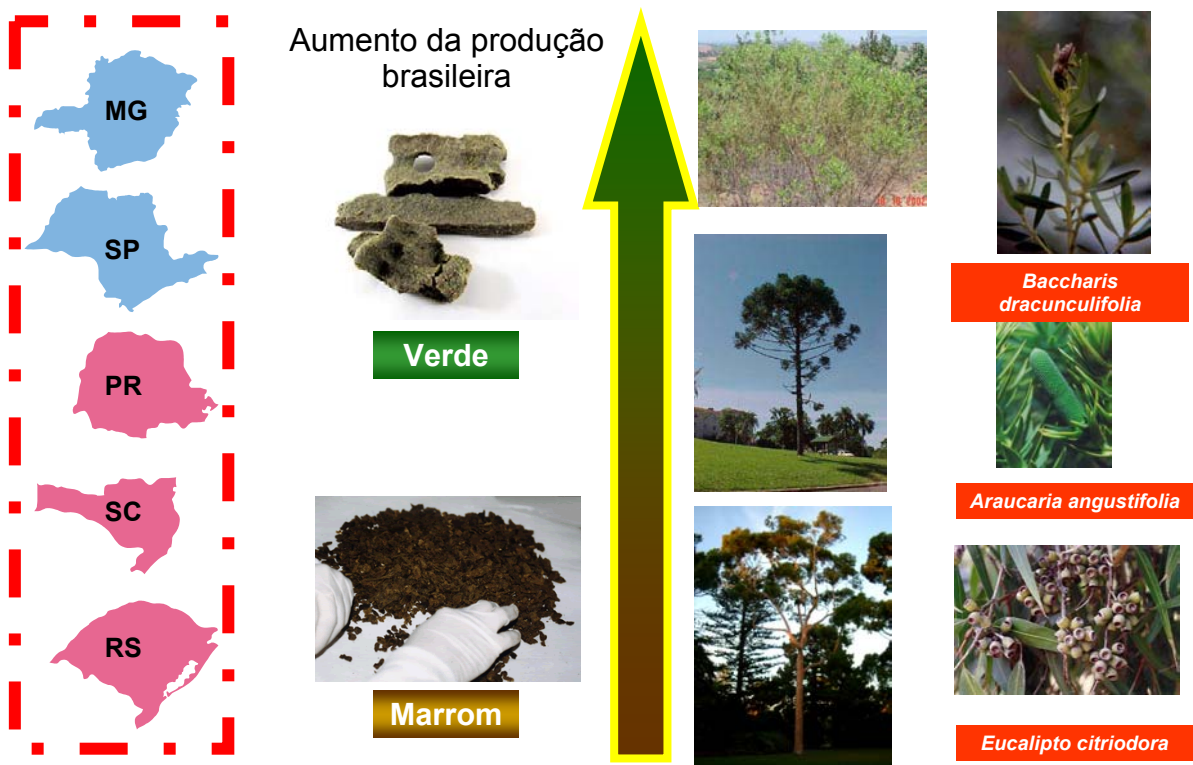


Figura 2: Característica vegetal da região para a produção de própolis no Brasil.

1.2 Características organolépticas

A própolis é um material de caráter lipofílico, duro e quebradiço a baixas temperaturas, mas macio, maleável e viscoso quando levemente aquecido (DEBUYSER, 1983). A própolis é uma substância de consistência variável em função da temperatura a que está sujeita. A uma temperatura de 15°C é compacta e dura, mais fácil de ser moldada ou reduzida a pó. Após 30 °C amolece, torna-se maleável, ficando viscosa e colante, até alcançar o ponto de fusão, o que acontece

mais ou menos entre 60 a 70 ° C, podendo atingir, às vezes, 100 °C ou mais. Aquecida em banho-maria, a própolis divide-se em duas partes bem distintas: uma viscosa que se acumula e precipita no fundo do recipiente e outra líquida (ceras de própolis) que sobrenada ou bóia na superfície e que serve para numerosas aplicações apícolas. A própolis é insolúvel em água fria, mas parcialmente solúvel por outros processos como por exemplo de ebulição a refluxo. Ela é em parte solúvel em acetona, álcool, amoníaco, benzina, cloroformio e outros solventes orgânicos apolares (MARQUES, 1989).

A cor da própolis é muito variável, dada a grande e variada coloração dos vegetais fornecedores da sua matéria-prima nas diversas regiões de “habitat” e de coleta. Assim, a própolis não é caracterizada por uma única cor (MARQUES, 1989), variando entre amarelo-esverdeado ao marrom-escuro (DEBUYSER, 1983; VERRÍSSIMO, 1980).

O sabor da própolis é geralmente acre e, às vezes, amargo. O aroma tem tons balsâmicos agradáveis, algumas vezes adocicados à semelhança do mel, ceras e outros produtos como odor e sabor de canela, baunilha, etc (DEBUYSER, 1983; MARQUES, 1989).

A fragrância característica, que a própolis possui, deve-se principalmente presença de óleos essenciais, cujos tipos, até hoje determinados, somam cerca de 30. Destes, o acetato de linalina, acetato de benzila, acetil benzóico são os óleos essenciais presentes no jasmim e lavanda (MATSUNO, 1997).

1.3 Composição química

A própolis apresenta substâncias de origem vegetal e substâncias de origem animal, ou seja, da própria abelha, como por exemplo, os ácidos graxos. Estima-se que a própolis possui mais de trezentos componentes distintos, e, devido a esta grande complexidade, é extremamente difícil de identificar qual a substância responsável por sua atividade terapêutica. Alguns autores afirmam que sua eficácia estaria justamente na composição química heterogênea (MATSUNO, 1996).

Em 1927, a cor da cera das abelhas foi atribuída à presença de pigmentos de flavanóide crisina. Em 1969, foram aplicadas técnicas modernas de separação química e foram isolados seis pigmentos do grupo das flavonas, duas flavononas e um composto aromático, a isovanilina, a quercetina e seus derivados (GHISALBERTI, 1979). Em 1992, foram isolados da própolis o ácido caféico e seus derivados ésteres, o ácido feniletil caféico e o ácido caféico-metilester (MATSUNO, 1997).

Para uma descrição detalhada dos constituintes químicos já descritos em amostras de própolis ver anexo 1 (VILLANUEVA et al, 1964; VILLANUEVA et al, 1970; DEBUYSE, 1983; SCHIRMER, 1986; WALKER e CRANER, 1987; BANKOVA, 1988; LEJEUNE et al, 1988; BANKOVA 1989; GREENAWAY, 1990; BANKOVA et al, 1992; TOMÁS-BARBERÁN et al, 1993; MARCUCCI et al, 1993; BANKOVA 1994; AGA et al, 1994; ARVOUET-GRAND et al, 1994; MARCUCCI, 1994; BANKOVA et al, 1995; MARCUCCI et al, 1996; MIYATAKA et al, 1997; NEGRI et al, 1998; SISA, 1998; CELLI et al, 2004; POPOVA et al, 2004; MAJIENE et al, 2004).

Entre os grupos biologicamente ativos mais importantes descritos na própolis, estão os compostos fenólicos (BOUDOUROVAKRASTEVA et al, 1997;

MARCUCCI et al, 1998); os compostos fenólicos correspondem a mais de 50% do peso total da própolis (MARCUCCI, 1995). Os flavanóides são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não de um anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado (MARCUCCI et al, 1998).

Park et al (2004) classificaram a própolis brasileira em doze grupos distintos, obedecendo a critérios de similaridade físico-química das amostras. Foram encontradas cinco tipos diferentes na região sul do Brasil, um na região sudeste e seis na região nordeste. Nestas amostras, foram realizados estudos para avaliar a composição qualitativa e quantitativa de flavanóides e compostos fenólicos das amostras de própolis provenientes das diversas regiões do Brasil. Neste trabalho foi demonstrado que houve variação muito grande tanto qualitativa como quantitativa dos compostos fenólicos das amostras de própolis analisadas (na forma de extrato etanólico) (PARK; MASAHARU,1995). Em geral, as amostras da região Sul e Sudeste apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos. Além disso, houve nítida diferença qualitativa dos diferentes extratos entre amostras de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. A figura 3 apresenta um resumo das principais classes de compostos encontradas na própolis.

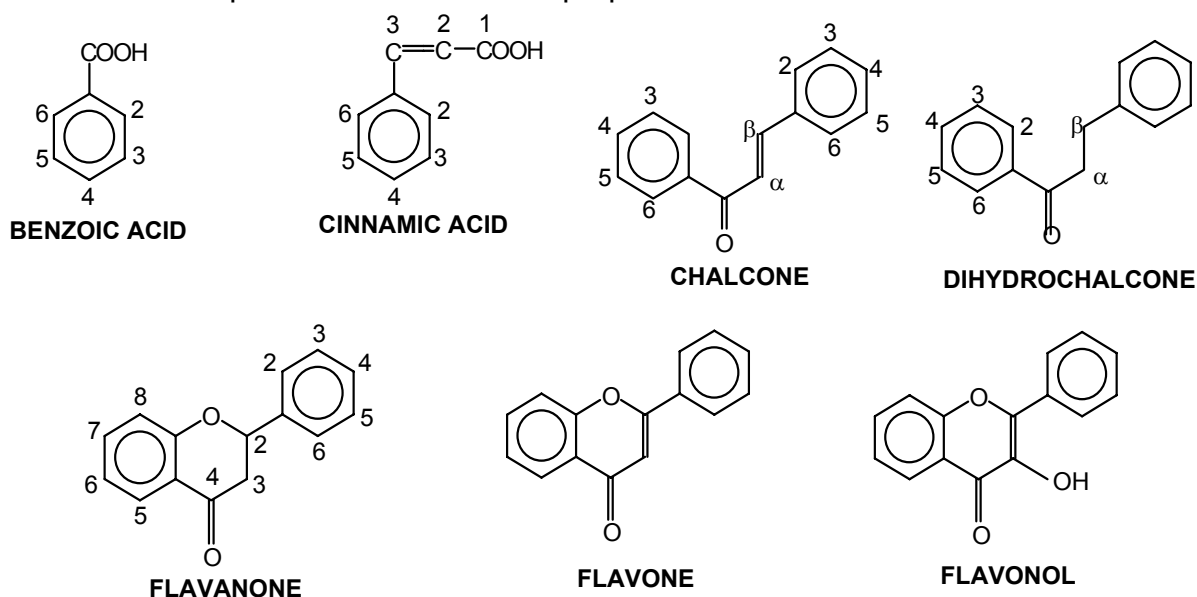


Figura 3: Principais classes de compostos presentes na própolis.

A grande quantidade de flavanóides, ácidos fenólicos e outras substâncias químicas presentes na própolis são as bases das suas propriedades biológicas (SCHIMIDT, 1996; GREENAWAY et al, 1990; MARCUCCI; BANKOVA, 1999; KUMAZAWA et al, 2003; PARK et al, 2004).

Apesar do grande número de relatos químicos e biológicos publicados sobre própolis na última década, boa parte dos estudos envolve amostras coletadas em países europeus que possuem características químicas definidas e origens botânicas bem estabelecidas, especialmente vinculadas a espécies de *Populus* (*P. nigra*, *P. canadensis*, *P. verrucosa*, *P. tremula* ou *P. suaveolens*).

Nestas amostras européias, os flavonóides são o grupo químico presente em concentrações majoritárias e o principal constituinte químico bioativo encontrado é o éster do ácido caféico, feniletil cafeato (CAPE) que é descrito como um potente inibidor específico da ativação do fator de transcrição nuclear NF κ B e inibidor do tumor de pele induzido por ésteres de forbol (NATARAJAN et al, 1996; HUANG et al, 1996; WU, 2000; CALIXTO et al 2003; 2004), além de outras atividades biológicas, incluindo a atividade antiinflamatória (SUD'INA et al, 1993; CALIXTO et al, 2000; MONTPIED et al, 2003; CICALA et al, 2003; NAGAOKA et al, 2003; BORRELLI et al, 2002; ROSSI et al, 2002; RUSSO et al, 2002). Assim, o teor de CAPE, presente nas amostras de própolis européia tem sido utilizado como indicativo da qualidade comercial dessas amostras.

Diferentemente dos países de clima temperado, no Brasil, a rica composição da flora oferece às abelhas um grande número de plantas resiníferas de onde as mesmas coletam as secreções para o processo de propolinização. A principal fonte botânica para a produção da própolis da região sudeste do Brasil é a resina coletada das espículas foliculares de *Baccharis dracunculifolia* L.

(Asteraceae), conhecida popularmente como alecrim-do-campo ou vassourinha (GREENAWAY et al, 1990; MARCUCCI; BANKOVA, 1999; KUMAZAWA et al, 2003; PARK et al, 2004). Enquanto isso, no sul do Brasil, além da *B. dracunculifolia* L., as resinas secretadas por espécies de coníferas, *Araucaria angustifolia* L., conhecida por pinheiro serrano e por *Eucalipto citriodora* mais ao sul do Brasil (BANKOVA et al 1999; MIDORIKAWA, 2004) contribuem decisivamente para a produção de própolis.

Park et al (2004), analisando o perfil químico comparativo por HPLC de extratos obtidos da planta *B. dracunculifolia* com extratos de própolis oriundos do sudeste do Brasil, demonstraram inúmeras similaridades. Essas evidências foram sustentadas pela comparação das características químicas e biológicas de extratos de própolis verde com o extrato de *Baccharis dracunculifolia* pelo método da espectroscopia de massa (BANKOVA et al, 1999; KUMAZAWA, 2003, PARK et al, 2002, 2004), bem como pela avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* (LEITÃO et al, 2004).

Além da *B. dracunculifolia* L. o sul do Brasil ainda oferece duas outras espécies propolinizadoras para as abelhas que são o *Eucaliptus citriodora* e a *Araucária angustifolia* (Figura 4).



10.10.2002 *B. dracunculifolia L*



Araucária angustifolia



Eucalyptus citriodora

Figura 4: Espécies de plantas com função propolizadora no sul e sudeste brasileiro.

A constituição química da própolis do sul do Brasil foi avaliada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), denominada aqui de “P1”, e foi utilizada em todos os nossos experimentos. A presença dos compostos fenólicos serviu de indicador para a padronização química da própolis P1. Na figura 5 está apresentado o *fingerprint* (perfil cromatográfico) da própolis P1 (MARCUCCI et al, 2002; PAULINO et al, 2003).

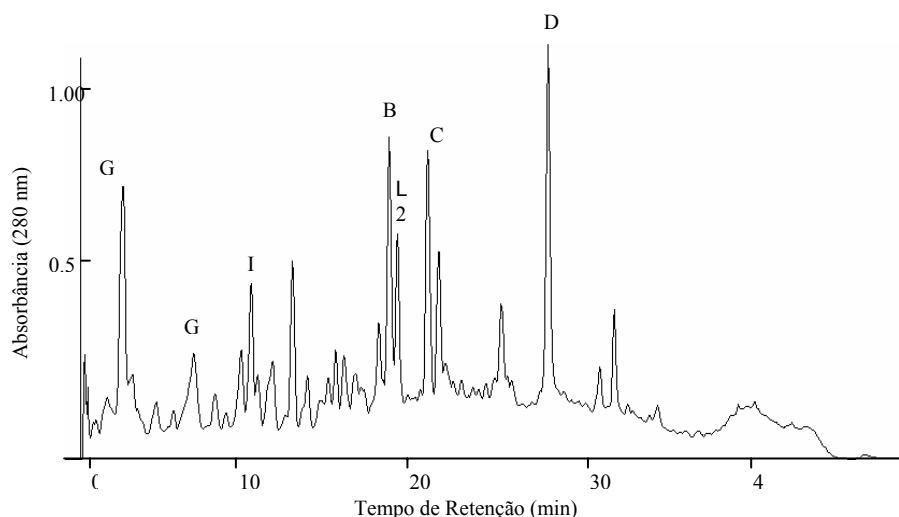


Figura 5: Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da amostra de extrato de própolis do sul do Brasil (P1). Os solventes usados foram água e ácido fórmico (95:5, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B). A eluição foi realizada com um gradiente linear e taxa de fluxo de 1 mL/min⁻¹. A detecção foi monitorada em 280 nm. Pico G2: 3-Metoxi-4-hidroxicinamaldeído (Composto G2 – 2,24 mg/g). Pico I: 2-[1-hidroximetil]vinil-5-acetil-hidroxicumarano (Composto I – 8,97 mg/g). Pico B: ácido 3-Prenil-4-hidroxicinâmico (Composto B - 17,90 mg/g). Pico L2 (2,2-Dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (Composto L2 – 11,01 mg/g). Pico C: 2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (Composto C – 18,26 mg/g). Pico D: ácido 3,5-Diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepilin C, Composto D – 26,21 mg/g).

Nas amostras de própolis testadas (P1) a concentração média encontrada para os compostos G2, I, C ou D foram respectivamente 2,24; 8,97; 18,26 e 26,21 mg/g de extrato seco. (ver tabela 1 e 2) (MARCUCCI et al., 2002)

Tabela 1: Estruturas químicas dos principais compostos presentes na própolis Brasileira:

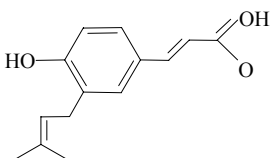
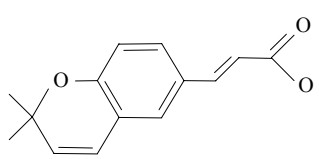
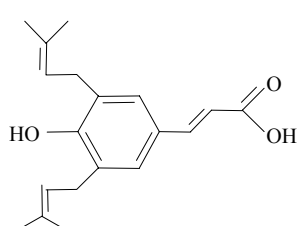
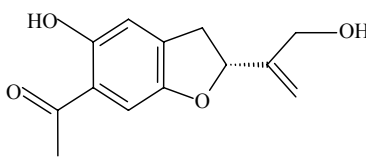
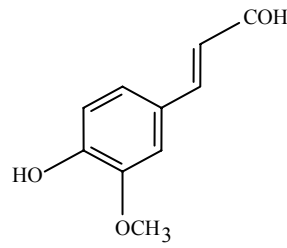
Composto	Nome químico	Estrutura química
Composto B	ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	
Composto C	2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	
Composto D (Artepillin C)	ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	
Composto I	2-[1-hidroximetil] vinil-6-acetil-5-hidroxi-cumarano	
Composto G2	3-metoxi-4-hidroxicinamil aldeído	

Tabela 2: Principais constituintes químicos presentes na amostra de extrato de própolis P1 e seus respectivos rendimentos:

Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (mg/g de resina)	Rendimento (%)
Composto G1	1,17	6,77	0,7
Ácido cafeíco	2,59	2,06	0,2
Ácido gentísico	4,08	1,94	0,2
Composto G2	5,52	2,24	0,2
Ácido benzóico	6,53	1,45	0,1
Der. 1 ácido cafeíco	10,59	4,94	0,4
Composto I	11,17	8,97	0,9
Pinobanksina	11,57	2,67	0,3
Der. Ácido cumárico	14,53	3,75	0,4
Composto B	19,39	17,90	1,8
Composto L2	19,89	11,01	1,1
Composto C	21,71	18,26	1,8
Derivado 2 ácido cafeíco	26,08	5,82	0,6
Artepillin C	28,88	26,21	2,6

1.4 Utilização industrial da própolis

A própolis tem sido utilizada não somente como anti-séptico, mas também em preparações cosméticas como: cremes faciais, pomadas, loções e soluções (DEBUYSER, 1983; HAUSEN et al, 1987). Essas formulações apresentam vantagens devidas as suas atividades antibacterianas, revitalizando e umectando a

pele e melhorando com isso a elasticidade e controle da oleosidade. Soluções contendo 3% de própolis ajudam na regulação do pH da pele (PARK e WOO, 1996).

Foi também utilizada como conservante em cosméticos e pomadas anti-herpes (POPESCU et al.1985). Foram relatadas algumas preparações a base de própolis: unguento, pomada, cápsula, “spray” bucal, tabletes (GOETZ, 1990), xampu, cremes e tinturas (CORTANI, 1991), preparações dermocosmetológicas: leite de limpeza para pele seca e normal, creme diurno para pele normal, oleosa e seca, creme nutritivo para pele normal e seca, creme para limpeza (LEJEUNE et al, 1988) e soluções antiacne (CLERICI, 1999; MARCUCCI, 1994;).

Para uso externo, a própolis é usada em bases de cremes nas concentrações de 5-8% e em bases de xampus nas concentrações de 2-5% (VANGELISTI, 1986). Os sabonetes glicerizados com própolis são indicados para acnes, ulcerações da pele, ótimo cicatrizante de ferimentos, após barba e todos os processos alérgicos e de tratamento regenerativo cutâneo (VANGELISTI, 1986).

Na França, diversos produtos cosméticos à base de própolis são comercializados incluindo cremes, água de colônia, xampus, sabonete, leite de toalete, loção pós-barba e bronzeador. Há também uma mascara vitaminada com própolis comercializada pelos laboratórios Catharine Moreau (Paris).

Na Romênia é comercializado um creme de própolis que apresenta propriedades emolientes, regenerativas de tecidos e desinfetantes. A Romênia e a Rússia possuem as principais especialidades medicamentosas à base de própolis tais como: acneol® (extrato fluido de própolis, glicerina, ácido salicílico e mentol) utilizado contra acne, óleos de própolis® (20% de própolis em azeite de oliva) propolan® aerosol (preparação a base de própolis com outros produtos ativos) ambos para uso dermatológico.

Na Espanha é comercializada uma especialidade chamada Vigordenta® que é constituída de um extrato alcoólico de própolis e um sal de zinco, utilizado como anti-séptico bucal, hemostático e bactericida (DEBUYSER, 1983).

A própolis também tem sido utilizada por cirurgiões plásticos brasileiros em tratamento estético de peles com acne e rugas superficiais. Depois do “peeling” químico (superficial) com ácido glicólico, há uma esfoliação da pele e a produção de colágeno aumenta naturalmente, fazendo com que a pele fique mais macia e elástica. Após este peeling é aplicada uma pomada à base de própolis para evitar a formação de cicatrizes hipertróficas (LIRA, 1994; SCHELLER et al 1980; SHAMRAI, 1971; HRONEK et al, 2005).

Vários registros de patentes internacionais têm sido identificados no Intellectual Property Network, órgão de divulgação de patentes nos Estados Unidos. Entre elas podemos citar, como relevantes, a capacidade da própolis de inibição da formação de catarata, doença resultante do stress oxidativo, e da replicação do HIV pelos ésteres do ácido caféico (GRUNBERGER, 1997), como agente anti-tumoral (ARAI et al, 1998), por suas substâncias fisiologicamente ativas (YOSHIDA et al, 1994), por sua efetividade na remoção de verrugas (WISE e KONSTANTINOVIC, 1995), como agente controlador da apoptose (KIMOTO et al, 1998), derivados fenol benzopiranos para uso como agente antibacteriano, antiviral ou agente imunomodulador (MARKONIUS, 1995, 1999), para o tratamento de acne (PAUNESCO, 1992).

Essa notável lista de patentes e de produtos demonstra o interesse da indústria internacional por esta resina. Infelizmente, no Brasil a própolis ainda não é reconhecida nos órgãos oficiais de controle na área da saúde. Por esse motivo,

preparações à base de própolis com fins terapêuticos não podem ser oficialmente comercializadas no país.

Além disso, as exportações brasileiras no setor apícola a partir da década de 90 têm se tornado cada vez mais importante, sobretudo depois que o mercado asiático, especialmente o japonês, descobriu as qualidades da própolis brasileira. O Brasil é hoje um dos principais fornecedores mundiais dessa resina medicinal, e, com a crescente exigência de certificados de análise de qualidade dos produtos importados, está obrigando os apicultores brasileiros a apostarem na qualificação da sua produção para continuar competitivo neste concorrido mercado mundial.

As exigências internacionais para a qualidade dos produtos apícolas obrigaram o Brasil a estabelecer normas para definir padrões mínimos de comercialização dos produtos originários da colméia, especialmente para a própolis. Esta legislação, recentemente criada, regula parâmetros químicos e físico-químicos mínimos para as amostras de própolis aptas para comercialização. Todavia para a própolis, que possui preponderantemente atividade terapêutica, esses parâmetros, subjetivos de qualidade, deveriam ser complementados com uma avaliação farmacológica para o monitoramento das propriedades biológicas.

Tais procedimentos, certamente, agregariam valor ao produto apícola brasileiro e o levaria a alta competitividade internacional. Países como a China, Austrália, e mais recentemente os nossos vizinhos: Argentina e Uruguai estão instalando suas redes nacionais de laboratórios para o controle de qualidade químico e biológico das suas amostras apícolas, garantindo o seu espaço no mercado mundial e assegurando a longevidade de suas inserção no comércio exterior.

É, portanto, urgente que o Brasil, que detêm uma grande fatia desse mercado mundial, possa neste momento de transição para um novo milênio, no qual a qualidade dos produtos será o grande diferencial competitivo, ter instalado em nível nacional uma cadeia de laboratórios de referência para o estabelecimento dos padrões internacionais mínimos exigidos para a comercialização, e que possa estabelecer e disciplinar a comercialização dos nossos produtos dentro e fora do país. Para isso é necessário que tenhamos informações precisas a respeito da composição química dos vários tipos de própolis produzidos no Brasil e sua relação com as atividades terapêuticas para as quais deverão ser comercializadas. Neste contexto a escolha de um biomarcador químico pode representar um avanço significativo nos parâmetros de exportação e na validação interna de nossos produtos à base de própolis.

O estabelecimento imediato da Rede Nacional de Laboratórios de Qualidade em Produtos Apícolas, ainda que necessariamente em multicentros, poderá atender a demanda das empresas brasileiras e pode, através de convênios específicos supervisionados pelo governo federal, desenvolver o trabalho qualitativo determinando a sobrevida do Brasil no mercado apícola internacional.

Os principais estados produtores de própolis no Brasil são: Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 6).



Figura 6: Produção nacional de própolis e as características da própolis produzida que varia do marrom, mais ao sul, até o verde intenso, na região do triângulo mineiro.

1.5 Propriedades biológicas

Inúmeras propriedades biológicas e/ou farmacológicas têm sido descritas para amostras de própolis de várias origens geográficas no mundo. O número de publicações envolvendo o tema própolis cresceu drasticamente na última década, e os trabalhos com a própolis brasileira tiveram seu início a partir de 1995 contribuindo a partir daí com 14% (1995-2000), subindo para 20% (2000-2004) e já alcançou a média de 30% (só em 2005) das publicações indexadas no Medline e/ou Pubmed. Isso demonstra a importância crescente que a própolis brasileira tem assumido para a comunidade científica mundial.

As principais atividades descritas para a própolis envolvem:

Antiviral (DEBIAGGI, 1990; SCHIMIDT, 1996; BURDOCK, 1998; SCHELLER et al, 1998; KUJUNGIEV et al, 1999; CHOI et al, 1999; VYNOGRAD et al, 2000; HULEIHEL ; ISANU, 2002; ABD AL HADY et al, 2003; ILHAN et al, 2004). Antibacteriana (METZNER et al, 1975, 1979; GRANGE et al, 1990; AGA et al, 1994; KAIN et al, 1996; KUJUMGIEV et al, 1999; BANKOVA et al, 1999; MARCUCCI, 1995; KARTAL et al, 2003; SANTOS et al, 2003; UGUR ; ARSIAN, 2004). Fungicida (SCHELLER et al, 1977, 1978; MILLET-CLERC et al, 1987; BANKOVA et al, 1999; CHOI et al, 1999; KUJUMGIEV et al, 1999; OZEAN 2004). Anti-ulcerogênica (BRUMIFITT et al, 1990; MARCUCCI,1995; LIU et al, 2002; BOYANOVA et al, 2003). Anti-hipertensivo (SCHELLER et al, 1988), antiprotozoário (METZNER et al, 1975; HOLDERNA ; KEDZIA, 1987; TORRES et al, 1990; HIGASHI et al, 1991; AMOROS et al, 1992a, 1992b; MATSUNO,1992; KROL et al, 1993; SCHELLER et al, 1998; SILVA FILHO et al, 2004; SILVA CUNHA et al, 2004). Cicatrizante (LINDENFELSER, 1967; SCHELLER et al, 1977a; SAKAMOTO, 1994; MATSUNO et al, 1994; MARCUCCI et al, 1996; VOLPERT; ELSTNER, 1996). Antioxidante (KROL et al, 1990; SCHELLER et al, 1990; DOBROWOSKI et al, 1991; SCHIMIDT, 1996; VOLPERT; ELSTNER, 1996, ICHIKAWA et al, 2002; SHINOHARA et al, 2002; SIMÕES et al, 2004; SHIMIZU et al, 2004). Anticárie (IKENO et al, 1991; STEINBERG et al, 1996; KOO et al, 1999; BOTUSHANOV et al, 2004). Antitumoral (SCHELLER et al, 1989; BURDOCK 1998; SUGIMOTO et al, 2003; ORSOLIC et al, 2003; SEIFO et al, 2004; CHEN et al, 2004; ORSOLIC et al, 2004; ASO et al, 2004), antiacne (DEBUYSER, 1983). Hepatoprotetora (MERINO et al, 1996; BASNET et al, 1996; LIN et al, 1997; BANSKOTA et al, 2001; EL-KHATIB et al, 2002; SEO et al, 2003; SHUKLA et al, 2004; LIU et al, 2004). Imunoestimulante e reforçadora do sistema imunológico (PAINTZ; METZNER, 1979 ; BANKOVA et al, 1983 ; WANG et

al, 1993; KHAYYAL et al, 1993 ; IVANOVSKA et al, 1995; SCHIMIDT, 1996; VOLPERT; ELSTNER, 1996; MIRZOEVA; CALDER, 1996; MENEZES et al, 1999; HAN et al, 2002; SA-NUNES, 2003; CARDILE et al, 2003; SANGVAI et al, 2004; COHEN et al, 2004)

Além das atividades biológicas descritas anteriormente, a própolis e seus constituintes possuem propriedades antiinflamatórias descritas em diferentes modelos de inflamação, incluindo a artrite induzida por formaldeído, edema de pata induzido por PGE₂, carragenina ou radiação (DOBROWOLSKI et al, 1991; EL-GHAZALY e KHAYYAL, 1995; PARK et al, 1996; PARK; KAHNG, 1999), bem como na inflamação aguda induzida por zimozan (IVANOVSKA et al, 1995). Em vários desses estudos foi observado que a própolis apresentou eficácia semelhante aos antiinflamatórios utilizados como controle positivo nos experimentos. Além disso, o flavonóide hesperidina, presente em amostras de própolis europeia, mostrou efeito similar ao da indometacina no edema induzido pela carragenina em ratos (EMIM et al, 1994).

Estudos realizados com preparações de pulmão de cobaias sensibilizadas com ovoalbumina mostraram que a própolis apresentou um efeito inibitório sobre a liberação de prostaglandinas, leucotrienos e histamina, contribuindo assim para explicar, pelo menos em parte, seu efeito antiinflamatório observado nos experimentos in vivo (KHAYYAL et al, 1993). De maneira similar, MIRZOEVA; CALDER (1996) demonstraram que a própolis e alguns de seus constituintes produziram supressão da produção de prostaglandinas e de leucotrienos, sendo o CAPE o componente bioativo mais potente para este efeito.

Outro estudo interessante foi realizado em coelhos após cauterização de córnea, submetidos ao tratamento com própolis, extrato alcoólico (OZTURK et al,

2000) ou extrato aquoso (HEPSEN et al, 1999). Nesses estudos, a própolis mostrou efeito semelhante à dexametasona na redução dos efeitos antiinflamatórios associados ao processo cirúrgico. Foi demonstrado ainda que a própolis promoveu a inibição da enzima hialuronidase contribuindo para o efeito antiinflamatório e regenerativo na cicatrização (IKEGAKI et al, 1999).

Além disso, foram analisados quatorze extratos de própolis comerciais brasileiros de diversas regiões do Brasil no modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico em camundongos. Desses extratos, pelo menos quatro das amostras testadas apresentaram efeito antiinflamatório similar àquele produzido pela indometacina (MENEZES et al, 1999), variando significantivamente dependendo da região de onde era oriundo.

Apesar de todos esses relatos experimentais demonstrando inúmeras evidências para o efeito biológico da própolis, ainda não foi completamente demonstrado qual ou quais dos compostos presentes na própolis brasileira é ou são o(s) representante(s) químico responsável por esses efeitos.

Acredita-se que as principais atividades farmacológicas descritas para a própolis brasileira estejam diretamente relacionadas com a presença de flavonóides e compostos fenólicos, especialmente o Artepillin C®, patenteado pela indústria farmacêutica japonesa (Hayashibara Pharmaceutica Co, Okayama, Japão). O Artepillin C possui atividades antineoplásica (KIMOTO et al, 1996, 1998, 2000, 2001a, 2001b; AKAO et al, 2003; MATSUNO et al, 1997; SUGIMOTO et al, 2003) e antioxidante (NAKANISHI et al, 2003; SHIMIZU et al, 2004). O Artepillin C® teve sua rota sintética descrita por UTO et al, (2002a, 2002b; NAKANISHI et al, 2003) e foi caracterizado quimicamente como sendo o ácido [3-{4-hidroxi-3,5-di(3-metil-2-butenil)fenil}2-(E)-propenóico] (ver figura tabela 1).

O Artepillin C tem recebido especial atenção por ser o componente majoritário presente nas amostras de própolis brasileira, e por ter apresentado importantes atividades biológicas similares às aquelas demonstradas para o extrato de própolis. Comercialmente, o Artepillin C já é utilizado nas transações para definir a qualidade do lote de própolis brasileira a ser exportado para o mercado asiático. Contudo, ainda faltam estudos farmacológicos bem conduzidos que justifiquem com segurança o uso do Artepillin C como marcador biológico para a atividade da própolis.

Apesar do grande número de trabalhos publicados que confirmam as atividades biológicas da própolis ou dos seus constituintes, relativamente poucos estudos têm se dedicado aos aspectos farmacocinéticos dos seus principais compostos bioativos. Os primeiros ensaios que relatam a presença de biomarcadores na própolis brasileira foram publicados por pesquisadores japoneses (KIMOTO et al 2001; SHIMIZU et al 2004). Nesses estudos, o Artepillin C foi identificado como sendo o principal composto bioativo e responsável pelas atividades antitumoral e antioxidante.

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a amostra de própolis padronizada P1 apresentou atividade antinociceptiva em vários modelos de dor em camundongos e ratos, incluindo a nocicepção causada pelo ácido acético, caolin e zimozan, bem como foi efetivo em inibir ambas as fases, neurogênica e persistente, da dor induzida pela formalina, ou ainda na dor induzida pela capsacina (CAMPOS et al, 1998).

No presente estudo, pretende-se avaliar através de diferentes procedimentos farmacológicos e bioquímicos a atividade antiinflamatória do extrato padronizado de própolis do sul do Brasil (P1), e demonstrar que o Artepillin C pode

ser utilizado como marcador químico para garantir a qualidade destas amostras de própolis.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar com auxílio das técnicas farmacológicas e bioquímicas *in vivo* e *in vitro* os efeitos antiinflamatórios e alguns dos mecanismos envolvidos nas ações do extrato da própolis P1 e do seu principal constituinte, o Artepillin C.

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade antiinflamatória do extrato de própolis P1 e do Artepillin C em modelos animais de inflamação: edema de pata, pleurisia e peritonite.
- Avaliar, através de métodos de biologia molecular, o possível envolvimento do extrato de própolis e do Artepillin C nas vias do óxido nítrico em macrófagos murinos, da proteína quinase ativada por mitógeno (p-38 MAPK) em células de músculo liso vascular e do fator de transcrição nuclear Kappa B em cultura de células de rim humano.

- Avaliar a farmacocinética de absorção do Artepillin C a partir do extrato de própolis P1 administrado pela via oral em camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Própolis

3.1.1 Preparo do Extrato Padronizado

A própolis utilizada no presente estudo foi fornecida gentilmente pela empresa Apis Nativa Produtos Naturais (www.prodapys.com.br) e foi denominada de P1 ao longo de todos os experimentos. A padronização do extrato foi feita através do seguinte procedimento: amostras de própolis P1 foram coletadas por apicultores da região do vale de Araranguá, foram limpas separadas de impurezas macroscópicas e congeladas a temperatura de -4°C por dois dias. Em seguida foram trituradas em moinho mecânico e adicionada ao líquido extrator (álcool de cereais). Após percolação por sete dias, o extrato foi filtrado e concentrado em soxhlet para a concentração de 10% de resíduo seco. A cada lote, o perfil químico foi reavaliado.

3.1.2 Avaliação cromatográfica, isolamento e identificação química dos compostos majoritários presentes na própolis P1

As amostras de própolis foram padronizadas quimicamente pela Prof^a Maria Cristina Marcucci, na Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN) como descrito em Marcucci et al (2002). Os constituintes químicos isolados da própolis foram fornecidos com as seguintes denominações: composto G2, composto I, composto C (MARCUCCI et al, 2002) e o Artepillin C foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Hitoshi Hori e Yoshihiro Uto do Department of Biological Science & Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima, Tokushima, Japão.

3.2 Avaliação da atividade antiinflamatória

3.2.1 Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados utilizando camundongos machos Suíços pesando entre 25 e 30 g, fornecidos pelo Biotério da Universidade do Sul de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em sala com temperatura controlada (23-25 °C) em um ciclo claro-escuro de 12 h, com acesso livre à água e ração. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas de manejo experimental de animais de laboratório e normas para investigação em animais

conscientes (Zimmerman, 1983), aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISUL (CEP-UNISUL).

3.2.2 Edema de pata em camundongos

Os animais foram ligeiramente anestesiados com éter e receberam injeção intraplantar de 20 μ L de tampão fosfato (PBS) contendo carragenina (300 μ g/pata intraplantar) na pata direita. A pata contralateral esquerda recebeu 20 μ L de PBS estéril e foi usada como controle da resposta edematogênica produzida pela carragenina.

Os animais receberam como tratamentos: NaCl 0,9% (controle), indometacina (1 mg/Kg i.p ou 10 mg/Kg v.o) (controle positivo), própolis P1 (1 ou 10 mg/Kg i.p 30 min antes e 10 ou 100 mg/Kg v.o, 60 min antes), ou Artepillin C (1 ou 10 mg/Kg i.p) 30 min antes da indução do edema pela injeção subplantar com carragenina (300 μ g/pata). A resposta edematogênica foi avaliada em pletismômetro (Hugo Basile, Itália) como a diferença de volume (μ L) entre as patas direita e esquerda em vários intervalos de tempo após a injeção de carragenina.

3.2.3 Peritonite em camundongos e determinação dos níveis de PGE₂ no lavado peritoneal

Para a indução da peritonite, os animais foram ligeiramente anestesiados com éter e submetidos à injeção de 0,1 mL/10 g de animal de solução de

carragenina (1%) na cavidade peritoneal (100 mg/Kg). Decorridas 4 h, os animais foram sacrificados em camara supersaturada com éter etílico e imediatamente submetidos à cirurgia para abertura do abdômem (CARLSSON; RIPE, 1999). A cavidade peritoneal foi então lavada com 1 mL de PBS mais heparina (20 UI/mL) e o líquido foi coletado através de uma pipeta automática. O total de leucócitos foi contado em câmara de Neubauer sob microscópio ótico após a diluição da amostra em líquido de Türk (1:200). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita através da coloração de uma lâmina com uma alíquota da amostra fixada e corada com solução corante May-Greenwald-Gimsa (AHUMADA et al, 1997) com pequenas modificações. Foi avaliado o número total de leucócitos por mL de lavado peritoneal expresso como a média \pm E.P.M. dos grupos analisados.

Os animais receberam como tratamentos: NaCl 0,9% (controle), dexametasona (0,5 mg/Kg) via i.p. (4 h) antes (controle positivo antiinflamatório), ou própolis P1 (10, 30 ou 100 mg/Kg v.o ou 1, 3 ou 10 mg/Kg i.p) ou Artepillin C (0,1, 1 ou 10 mg/Kg i.p) 30 min antes da indução da peritonite.

3.2.4 Pleurisia em camundongos

Os animais receberam como tratamentos: NaCl 0,9% (controle), dexametasona (0,5 mg/Kg) via i.p.) 4 h antes (controle positivo antiinflamatório), ou própolis P1 (10, 30 ou 100 mg/Kg v.o, 60 min antes ou 1, 3 ou 10 mg/Kg i.p) 30 min antes ou Artepillin C (0,1, 1 ou 10 mg/Kg i.p) 30 min antes da indução da pleurisia.

Todos os animais receberam, 24 h antes dos experimentos, uma solução de corante azul de Evans (25,0 mg/Kg, 0,2 mL, i.v.), afim de avaliar a extensão da exudação ocorrida na cavidade pleural (SALEH et al, 1996, FRÖDE et al, 2001).

Para a indução da pleurisia, os animais foram ligeiramente anestesiados com éter e submetidos à injeção de 0,1 mL de carragenina (1%) ou solução salina tamponada estéril, na cavidade pleural direita. Decorridas 4 h os animais foram sacrificados em câmara supersaturada com éter etílico e imediatamente submetidos à cirurgia para abertura do tórax. A cavidade pleural, foi lavada com 1 mL de PBS contendo heparina (20 UI/mL) e o exudato foi coletado através de uma pipeta automática.

A amostra do líquido pleural foi diluída com solução de Türk (1:200) e o total de leucócitos presente nesta amostra foi determinado com auxílio de uma câmara de Neubauer, avaliada sob microscópio ótico. A contagem diferencial dos leucócitos foi feita através da coloração com solução corante May-Grünwald-Giemsa. A diferenciação celular foi determinada visualmente, baseada nas características histológicas em microscópio ótico.

Uma amostra do líquido pleural foi separada (500 µL) para determinação colorimétrica em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm), do teor de Azul de Evans para a determinação do extravasamento pleural (SALEH et al, 1997; FRÖDE et al, 2001).

3.2.5 Determinação dos níveis de Prostaglandina E₂ no lavado peritoneal

Para avaliar a participação da PGE₂ na resposta antiinflamatória produzida pelo extrato de própolis P1 e pelo composto Artepillin C, alíquotas do lavado

peritoneal dos grupos tratados como descrito no item 3.3.2. foram separadas para determinação do conteúdo PGE₂. A quantificação dos níveis de PGE₂ foi feita através de Kit de ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems®). Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes. As concentrações de PGE₂ obtidos no lavado peritoneal foram expressas em pg/mL.

3.2.6 Atividade sobre a enzima Óxido Nítrico Sintase endotelial (eNOS)

Para avaliar a atividade da eNOS foram usadas células endoteliais vasculares humanas (EA.hy926), cedidas gentilmente pelo Dr C.-J.S. Edgell, Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, NC, que foram cultivadas como descrito em Leikert et al (2001). Células EA.hy926 estáveis e transfectadas com plasmídios contendo 3600 bp de promotor de eNOS (LI et al, 1998) foram usadas para avaliar a atividade da eNOS. As células foram tratadas com própolis P1 100, 300 ou 500 µg/mL ou com o forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 2 nmol/L (18 horas). Após o período de incubação, a produção de NO liberado no sobrenadante de cultura foi quantificado pelo ensaio de fluorescência da 4,5-diaminofluoresceína (Alexis Biochemicals, Grünberg, Alemanha) como descrito por Leikert et al. (2001).

Em ensaio paralelo, as células tratadas com própolis 100, 300 ou 500 µg/mL ou com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) 2 nmol/L, 18 h, foram lisadas e homogeneizadas para a análise por Western Blot para identificação da proteína correspondente a eNOS. Essa enzima foi detectada pelo anticorpo monoclonal anti-eNOS de camundongo (1:2500, BD Biosciences, Heidelberg, Alemanha, clone 3), o gliceraldeide-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que é usado como controle da

expressão proteica por um anticorpo monoclonal anti-GAPDH (1:1200, Chemi-con, Hofheim, Alemanha, MAB374) e visualizado em um estação de imagem da Kodak 440CF usando o reagente de quimioluminescência Renaissance Plus (ambos NEN Life Science).

Esses experimentos foram realizados durante o estágio técnico patrocinado pelo Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) na Ludwig Maximilians Universität München, Department of Pharmacy, Center of Drug Research-Pharmaceutical Biology nos laboratórios da Prof^a. Dr. Angelika M. Vollmar (Munique, Alemanha).

3.2.7 Produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7)

Macrófagos são importantes células moduladoras do processo inflamatório e desempenham papel crucial no desenvolvimento da inflamação e cronificação do processo patológico. Com o objetivo de investigar a influência do extrato de própolis P1 e do Artepillin C sobre a ativação de macrófagos *in vitro*, foram utilizadas células RAW 264.7. A linhagem de células de macrófagos/monócitos murinos, RAW 264.7 (ATCC – Rockville, EUA), foi utilizada com a permissão da Dra. Angelika Vollmar (Ludwig Maximilian Universität München, Munique, Alemanha) e foi mantida em crescimento até atingir confluência, entre as passagens 4 a 15 em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem vermelho de fenol, com 2 mM de L-glutamina suplementado com 5% de soro fetal bovino, 150 U/ml de penicilina, 150 µg/ml de estreptomicina e mantida em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂.

As células foram diluídas para a concentração de 2×10^5 células/mL. Dessa suspensão foram usados 200 μ L/poço em placas de 96 poços e essas placas foram mantidas durante a noite em repouso em incubadora (37°C , 5% CO_2) até o momento do uso. No dia seguinte, as células RAW 264.7 foram pré-incubadas com ou sem lipopolissacarídeo (LPS) na ausência ou presença do extrato de própolis P1 (10, 30, 100 ou 300 $\mu\text{g/mL}$) ou do Artepillin C (1, 3, 10 ou 100 μM) por um período de 20 h.

Como parâmetro da síntese de óxido nítrico, as concentrações de nitrito foram dosadas no sobrenadante das culturas celulares de macrófagos RAW 264.7 pelo método de Griess. Foram usados 100 μL do sobrenadante das culturas celulares e combinados com solução de Griess contendo: 90 μL de sulfanilamida (1% em H_3PO_4 a 5%) e 90 μL dihidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamino (0,1% em água), em uma placa de 96 poços, em seguida submetida à medida em espectrofotômetro em 550 nm, usando leitor de microplaca.

As concentrações de nitrito no sobrenadante foram determinadas pela medida comparativa com uma curva padrão de nitrito de sódio com concentrações de 0 a 20 nM (LEIKERT et al, 2002). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Estes experimentos foram realizados durante o estágio técnico patrocinado pelo Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) na Ludwig Maximilians Universität München, Department of Pharmacy, Center of Drug Research-Pharmaceutical Biology nos laboratórios da Prof^a. Dr. Angelika M. Vollmar (Munique, Alemanha).

3.2.8 Viabilidade celular (MTT)

Com o objetivo de verificar se o extrato de própolis P1 ou o Artepillin C afetavam a viabilidade das células RAW 264.7, foi realizado o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dimetiltetrazólio) (MTT, Sigma-Aldrich, Ingleheim, Alemanha), de acordo com o método descrito por Van de Loosdrecht et al., (1991) e padronizado nos laboratórios da LMU em Munique, Alemanha (MOSMANN, 1983).

Após a remoção do sobrenadante para a determinação do nitrito, as células foram incubadas a 37°C com MTT (0,5 mg/mL) por 45 min. Decorrido o período de incubação, o meio foi removido e foi adicionado 250 µL de DMSO, mantendo-se as placas sob agitação por 1 h ao abrigo da luz. A extensão da redução do MTT foi quantificada pela medida da densidade óptica em 550 nm, e expressa como de viabilidade entre o grupo controle e os grupos tratados.

3.2.9 Atividade p38-MAPK em cultura primária de célula muscular lisa vascular (VSMC) de ratos

As células VSMC foram isoladas de aortas torácicas de ratos Sprague-Dawley por digestão enzimática como descrito por (USHIO-FUKAI et al, 1996). As células cresceram em meio DMEM livre de vermelho de fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100

$\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e foram passageadas duas vezes por semana por descolamento com tripsina/EDTA e deixadas em frascos de cultura de 75 cm^2 .

Para a realização dos experimentos, as células utilizadas estavam entre as passagem de cultura 7 e 15 e usadas em um período de crescimento confluyente de 70 a 95%.

Para os experimentos de *Western blot* em VSMC, as células foram transferidas para discos de cultura de 60 mm e foram deixadas quiescentes em meio DMEM contendo 0,1% de soro fetal bovino durante a noite. As células foram pré-incubadas com o extrato de própolis (30, 100 ou 300 $\mu\text{g/mL}$) ou com DMSO 30 min antes da estimulação com angiotensina II por 10 min. Após o tratamento, as células foram lavadas em ambiente gelado e preparadas para o ensaio de *Western blot*, conforme descrito anteriormente por USHIO-FUKAI et al (1999) com pequenas modificações: o lisato das células VSMC foram preparadas em discos de 60 mm pela adição de tampão para lise (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM pirofosfato de sódio, 50 mM NaF, 1 mM ortovanadato de sódio, 1% Triton X-100, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil). O lisato foi limpo por centrifugação e a concentração de proteína foi determinada por dosagem bioquímica conforme instruções do fabricante do Kit (Pierce, Rockford, IL). O anticorpo anti-p38 MAPK (3,5 μl) foi adicionado a 200 μg da aliquota do lisato e misturado por uma noite a 4°C . Os tubos foram lavados três vezes com 500 μl de tampão de lise e ressuspenso em 25 μl de tampão contendo 1.5% de mercaptoetanol. Em seguida os tubos foram aquecidos por 5 min a 95°C e removido por centrifugação com descrito por Ushio-Fukai et al (1999). As formas fosforiladas das proteínas foram detectadas e quantificadas pelo aumento da quimioluminiscencia com uma estação de tratamento de imagem digital da Kodak 440 cf (Perkin Elmer, Köln, Alemanha).

Estes experimentos foram realizados durante o estágio técnico patrocinado pelo Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) na Ludwig Maximilians Universität München, Department of Pharmacy, Center of Drug Research-Pharmaceutical Biology nos laboratórios da Prof^a. Dr. Angelika M. Vollmar (Munique, Alemanha).

3.2.10 Atividade específica do NF κ B (Ensaio da Luciferase)

Visando investigar o possível efeito do extrato de própolis P1 e do Artepillin C sobre a atividade específica do NF κ B, foi usada uma linhagem celular transfectada com o gene p-NF κ B para expressar esse fator de transcrição. Essa linhagem de células embrionárias de rim humano (HEK 293) foi cedida pela Prof^a Angelika Vollmar e utilizada sob sua orientação e com o auxílio da Srta. Frau Elfriede Eppinger nos laboratórios desta Universidade.

As células HEK 293 foram mantidas em DMEM suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 unidades/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina (Gibco BRL, Alemanha). As células foram cultivadas em discos de cultura de 60 mm contendo $0,5 \times 10^6$ células em 4 mL de meio de cultura ou em discos de 100 mm contendo $1,5 \times 10^6$ células em 10 mL de meio de cultura adicionados de colágeno para melhorar a adesão celular à parede dos frascos de cultura.

Para os ensaios de transfecção, foram preparados 1 disco de 100 mm e 5 discos de 60 mm. Foram preparados 1 μ g de plasmídeo (p-NF κ B Luc) adicionados de 50 ng de Renila-Luc com a mesma quantidade de esperma de salmão como carreador de DNA por poço. E em seguida, as células foram mantidas em

incubadora com 5% CO₂ e a 37°C por 6 h. Logo após, o meio foi removido e elas foram lavadas com PBS contendo cálcio e magnésio para a remoção dos plasmídeos não incorporados. As células estavelmente transfectadas foram monitoradas pela incubação de Green Fluorescent Protein (GFP) que fluoresce em verde com transfecção positiva.

As células transfectadas foram posteriormente transferidas para uma placa de 24 poços na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço/500 µL, onde permaneceram em repouso até o dia seguinte. No momento do experimento, foram incubadas com própolis P1 (10, 30, 100 e 300 µg/mL), com Artepillin C (3, 10 ou 30 µM) ou com MG 132 (10 µM), um inibidor da ativação do NFκB, e mantidas em incubadora de CO₂ por 2 h. Após este pré-tratamento, as células foram estimuladas com TNFα (1 ng/mL) por um período de 6 h para ativação do sinal de transdução celular do NFκB. Decorridos este tempo experimental, elas foram lavadas cuidadosamente com PBS e acrescidas de *passive lysis buffer* conforme protocolo sugerido pelo fabricante do kit *Dual Luciferase Quick Reporter Protocol* (Promega, Ingelheim, Alemanha), permanecendo sob agitação por 15 min e então ressupensas neste tampão para a lise completa (DIRSCH et al, 2004)

Após este procedimento, as placas foram fechadas e mantidas em freezer durante uma noite para completar o processo de lise celular. No dia seguinte, todo o volume do lisado foi transferido para tubos de *ependorf* e centrifugado. Uma alíquota de 10 µl do sobrenadante foi transferida para os tubos de leitura do luminômetro e adicionados de 10 µl de *passive lysis buffer* para diluição e em seguida levado ao luminômetro para o registro da intensidade luminosa medida por 10 s pela emissão de unidades relativas de luz (Luminat, Molecular Devices Corporation, Califórnia, USA). A atividade da luciferase foi normalizada pela

atividade β -galactosidase medida em 414 nm em um colorímetro e apresentada como unidades de luciferase, correspondente à ativação do NF κ B.

Estes experimentos foram realizados durante o estágio técnico patrocinado pelo Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) na Ludwig Maximilians Universität München, Department of Pharmacy, Center of Drug Research-Pharmaceutical Biology nos laboratórios da Prof^a. Dr. Angelika M. Vollmar (Munique, Alemanha).

3.3 Avaliação farmacocinética da própolis P1 e do composto Artepillin C

3.3.1 Protocolo de tratamento

Camundongos machos, albinos, pesando entre 25 e 35 g, foram divididos em grupos de cinco animais, e cada grupo recebeu o seguinte tratamento por via oral: própolis P1 (100 mg/Kg), Artepillin C (10 mg/Kg). Após o tratamento os animais foram sacrificados em guilhotina e nos intervalos de tempo de 30 min, 1, 2, 4 ou 24 h após o tratamento, o sangue total de cada animal foi coletado. Após a coleta, o sangue foi imediatamente centrifugado por 15 min a 3.500 rpm para obtenção de um ml de soro que em seguida foram congelados para análise cromatográfica posterior.

3.3.2 Avaliação cromatográfica dos níveis de Artepillin C plasmático por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As amostras de soro dos grupos tratados com própolis P1 (100 mg/Kg) ou com o Artepillin C (10 mg/Kg), nos vários intervalos de tempo, foram submetidas à extração com metanol na proporção de oito vezes o volume de metanol para cada quantidade de amostra utilizada. Após a extração, uma alíquota da solução extratora foi injetada em HPLC para identificação dos picos referentes à presença do Artepillin C na amostra.

Para isso, 10 μ l da amostra de líquido extrator foi injetada para a determinação do espectro de ressonância magnética nuclear (NMR) que foi realizado em um equipamento Varian Gemini 300 e o deslocamento foi demonstrado em ppm em relação ao tetrametilsilano (TMS) em triplicata. O espectro ^{13}C -NMR foi obtido com o mesmo equipamento. Já o espectro de massa foi medido em um equipamento Hewlett-Packart modelo 5890 serie II Plus com detector de massa selecionado em HP modelo 5989B.

A coluna analítica preparativa para o HPLC foi de procedência Merck-Hitachi D-6000 (DAD Manager) com diodo e detector de arraste. O HPLC utilizado foi o modelo Merck-Hitachi equipado com uma bomba modelo L-6200, Merck-Hitachi, e detector de diodo com arraste modelo L-3000 da Merck-Hitachi. A separação foi obtida com auxílio de uma coluna Lichrochart 125-4 (Merck) (RP-18, 12,5 x 0,4 cm, com partículas de 5 μ m de tamanho) usando água, ácido fórmico (95:5, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B). A eluição foi feita com metanol (solvente B), com um gradiente linear e um fluxo de 1 ml/min, com a detecção em 280 e 340 nm.

Todas as análises foram cruzadas com os resultados de uma curva de calibração contendo somente Artepillin C nas mesmas condições experimentais acima citadas.

Esta parte experimental foi realizada com a colaboração da Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci, nos laboratórios da Universidade Bandeirante de São Paulo (São Paulo, SP), nos laboratórios da Naturalabor (Campinas, SP).

3.3.3 Avaliação cromatográfica dos níveis de Artepillin C plasmático por cromatografia gasosa acoplada a massa (CG-mass)

A coluna cromatográfica utilizada foi uma DB-5ms (30m x 0,25 mm ID x 0,25 FT) da Agilent, com cromatógrafo a gás modelo focus GC da Thermo-Finnigan, e espectrometro de massas modelo Focus DSQ da Thermo-Finnigan. A programação do forno foi: temperatura inicial de 50°C, sem isoterma inicial e com rampa de 10°C/min até 320°C, enquanto no injetor foi de 290°C e no espectrometro de massas foi de 230°C. Na interface entre o cromatógrafo e a fonte de ions a temperatura foi de 320°C. O metanol utilizado foi grau UV/HPLC da Merck. O padrão de Artepillin C foi cedido pelo Prof. Uto e Hori da Universidade de Tokushima (Japão).

Para a avaliação em cromatografia gasosa (CG), foram utilizadas amostras coletadas dos animais seguindo o mesmo protocolo experimental descrito para a avaliação por HPLC. Utilizando o método de monitoramento seletivo de ions (SIM) construiu-se uma curva de calibração com 6 concentrações diferentes entre 0,01 e 100 µg/ml. O padrão interno d14-terfenil foi utilizado na quantidade de 1 µg/ml

nos pontos da curva. A calibração feita apresentou um coeficiente de correlação linear de 0,996.

Todos esses ensaios foram realizados com a colaboração da Farmacêutica Juliana Catto, nos laboratórios da Analytical Solution Ltda (Florianópolis, SC).

3.4 Drogas e reagentes

Para os experimentos nos modelos de inflamação realizados *in vivo*, foram utilizadas as seguintes drogas: extrato etanólico de própolis P1 (produzido em nosso laboratório), carragenina (lâmbda grau IV), indometacina, dexametasona (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. USA); NaCl 0,9%, azul de Evans, solução de Türk, solução corante May-Greenwald-Gimsa, H₂O₂ (Laborclin Ltda, Pinhais, Paraná, Brasil).

Para os experimentos de cultura celular foram utilizados: DMEM suplementadas com 5% de soro fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomicina, lipofectamina (Gibco BRL); lactacistina (Alexis Biochemicals, USA); lipopolisacarideo (LPS), sulfanilamida, dihidroclorato de N-(1-naftil)etilenodiamino, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) (Sigma Chem Co. EUA); DMSO (Pierce, Rockford, IL, EUA).

Para o ensaio farmacocinético foi utilizado metanol, ácido fórmico, e demais reagentes para limpeza das colunas cromatográfica (todos os reagentes foram adquiridos junto a Merck Reagentes, São Paulo, Brasil).

3.5 Análise Estatística

Os resultados estão apresentados como a média \pm EPM, exceto as CE₅₀ ou DI₅₀ que estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança de 95% (FLEMING et al, 1972). Diferenças estatísticas em todos os experimentos foram determinadas pelo uso do teste ANOVA de uma via, seguidos pelos testes de Dunnet ou teste “t” de Student não pareado, quando indicado pelo programa Graph Pad Prism-Instat. Diferenças estatísticas foram indicadas para $P < 0,05$ ou menor.

Todos os ensaios em cultura de células foram realizados em triplicata e apresentados como a média aritmética das três leituras. $P < 0,05$ ou menor foi considerado como indicativo de significância, segundo o programa GraphPad Prism-Instat 4.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade antiinflamatória *in vivo*

4.1.1 Efeito do extrato de própolis P1 e do Artepillin C sobre o edema de pata induzido por carragenina

O tratamento dos animais com o extrato de própolis P1 (10 mg/Kg v.o) inibiu o edema de pata induzido pela carragenina em camundongos nos tempos de 60, 120, 240 e 360 min, em 29 ± 3 , 16 ± 4 , 36 ± 4 e $35\pm 5\%$, respectivamente. Na dose de 100 mg/Kg (v.o), as inibições observadas foram de 35 ± 5 , 34 ± 4 , 46 ± 4 e $46\pm 4\%$ respectivamente (Figura 8). A resposta inibitória para o tratamento dos animais com a indometacina (10 mg/Kg v.o) (usada como controle positivo) nos tempos de 60, 120, 240 e 360 min foi respectivamente 41 ± 3 , 26 ± 4 , 42 ± 4 ou $43\pm 3\%$ (Figura 7).

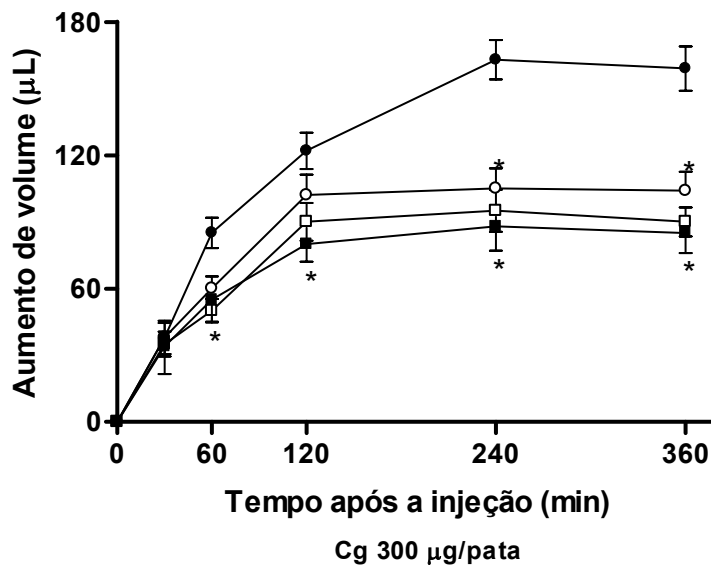


Figura 7: Efeito do tratamento dos animais com salina (●), própolis P1 10 (○), 100 (■) mg/kg ou com indometacina (□) 10 mg/Kg, via oral, sobre o edema de pata induzido pela injeção subplantar de carragenina (Cg, 300 µg/pata). Os resultados estão expressos como o aumento de volume das patas em µl e cada ponto representa a média de 5 animais ± os E.P.M. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes. * P < 0,05 quando comparados com os respectivos valores controle nos experimentos pelo uso do teste ANOVA de uma via, seguidos pelo teste “t” de Student não pareado.

Para avaliar a atividade antiedematogênica do Artepillin C comparativamente à própolis, os animais foram tratados por via i.p. com: extrato de própolis P1 (1 ou 10 mg/Kg), indometacina (1 mg/Kg), usada como controle de atividade antiinflamatória, ou com Artepillin C (1 ou 10 mg/Kg). Esses resultados estão expressos na tabela 3.

Tabela 3: Percentuais de inibição obtidos com o extrato de própolis e com seu constituinte Artepillin C ou indometacina no modelo do edema de pata induzido pela carragenina em camundongos.

Tratamento (mg/Kg i.p)	PERCENTUAIS DE INIBIÇÃO				
	Tempo após a injeção de carragenina (min)				
	30	60	120	240	360
P1 1	-	9,3 ± 1,8	16,6 ± 2,8*	20,6 ± 2,0*	21,2 ± 3,9*
P1 10	-	34,6 ± 2,9*	55,3 ± 4,1*	61,2 ± 3,8*	61,2 ± 4,1*
Art C 1	-	29,7 ± 5,5*	18,3 ± 6,6*	20,0 ± 6,3*	23,9 ± 5,9*
Art C 10	-	50,0 ± 6,3*	43,3 ± 3,6*	34,7 ± 6,9*	38,7 ± 4,9*
Indo 1	-	12 ± 2,0	39,4 ± 3,0*	50,0 ± 2,9*	51,5 ± 3,5*

* P < 0,05 ANOVA seguido do teste *t* de Student.

4.1.2 Efeito do extrato de própolis P1 (v.o) e do Artepillin C sobre a peritonite induzida por carragenina

O tratamento dos animais com o extrato de própolis P1 (10 mg/Kg v.o) não foi capaz de reduzir de maneira significativa o total de células induzido pela carragenina. Entretanto, quando os animais receberam a dose de 30 mg/Kg ou 100 mg/Kg (v.o.), houve redução de 41,0±3,4% e 53,0±3,8%, respectivamente (Figura 9), com uma DI_{50} estimada de 53,0 (48,1-57,9 mg/Kg). O tratamento dos animais com a dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) 4 h antes do experimento, como controle positivo, produziu redução significativa de 77,0±2,3% da migração celular. O número total de células residentes (basais) nos animais foi de $1,9 \pm 0,9 \times 10^6$ células/mL (Figura 8A).

O tratamento dos animais com extrato de própolis P1 (1 mg/Kg i.p) 30 min antes, não inibiu de forma significativa a resposta inflamatória induzida pela carragenina no peritônio. Todavia, o aumento da dose para 3 e 10 mg/kg, i.p., 30 min antes, produziu inibição da migração total de leucócitos no lavado peritoneal para $51,0 \pm 3,8\%$ e $73,0 \pm 4,6\%$, respectivamente, com uma DI_{50} estimada de 2,9 (2,0-3,8 mg/Kg), com eficácia similar a dexametasona. O tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) 4 h antes do experimento, produziu redução significativa ($77,7 \pm 5,5\%$) da migração de celular causadas pela carragenina na cavidade dos camunongos. O total de células residentes (basais) nos animais foi de $1,9 \pm 0,9 \times 10^6$ células /ml (Figura 8B).

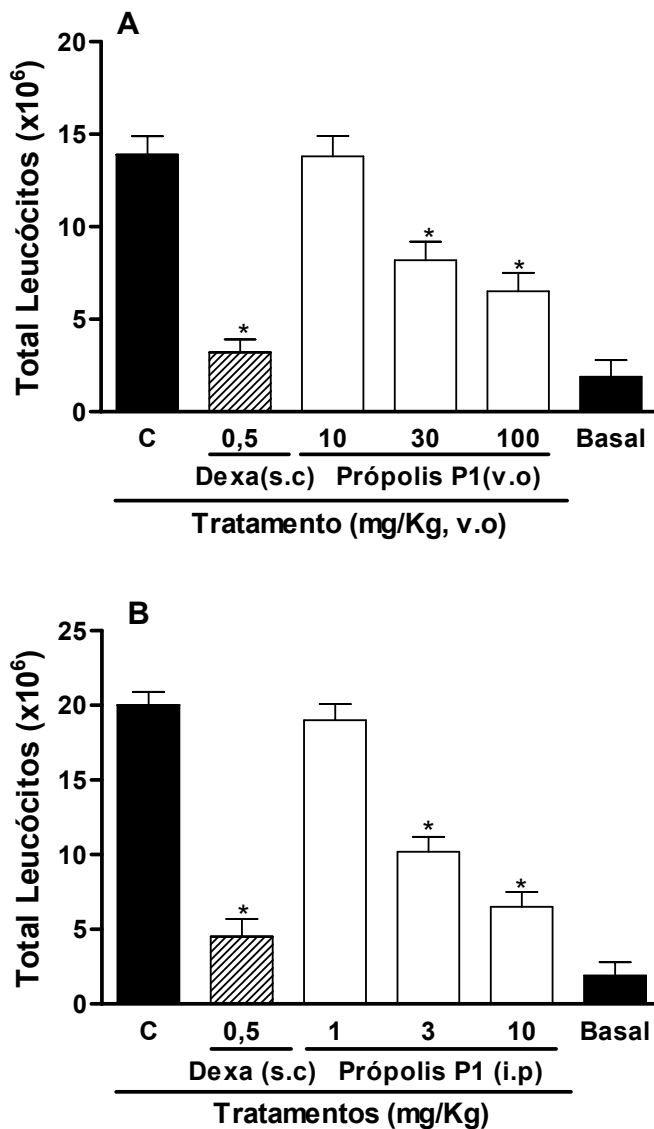


Figura 8: Efeito do tratamento com salina (C), dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) ou com o extrato de própolis P1 (10, 30 ou 100mg/kg) via oral (A) ou (1, 3 ou 10mg/kg) via i.p. (B), sobre o total de células presentes no lavado peritoneal dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 μ g/cavidade). Os resultados estão expressos como o aumento do número de células no lavado peritoneal e cada ponto representa a média de 5 animais \pm os E.P.M. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes. * P < 0,05 ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

No mesmo modelo de peritonite, o tratamento dos animais com o Artepillin C (0,1 mg/Kg, i.p.) 30 min antes, não produziu redução significativa das respostas inflamatórias induzidas pela carragenina. Todavia, as doses de 1 ou 10 mg/Kg (i.p, 30 min antes) do Artepillin C produziram inibição do total de leucócitos no lavado peritoneal de: $55\pm 4\%$ e $80\pm 3\%$, respectivamente (Figura 9), com uma DI_{50} estimada

de 0,9 (0,6-1,1) mg/Kg. O tratamento dos animais com dexametasona (0,5 mg/Kg, s.c.) 4 h antes) causou redução média de $73\pm 4\%$ da migração celular peritoneal em resposta a ação da carragenina (Figura 9).

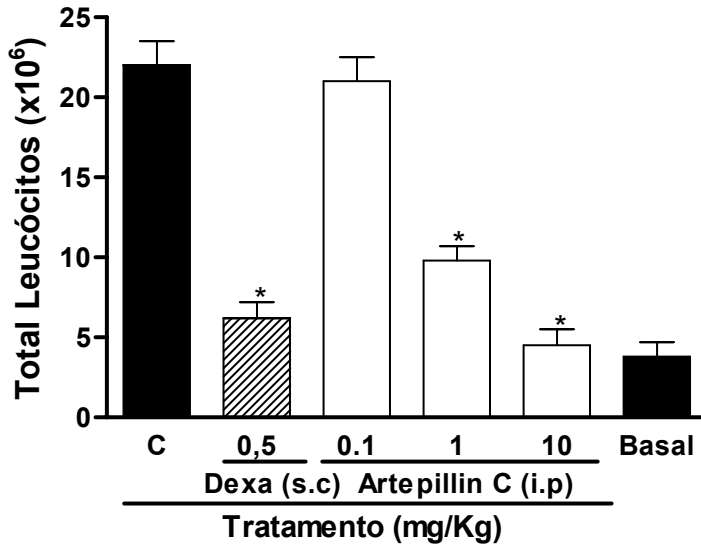


Figura 9: Efeito do tratamento com salina (C), dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) ou Artepillin C (0,1, 1 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre o total de células presentes no lavado peritoneal dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 μ g/cavidade). Os resultados estão expressos como o aumento do número de células no lavado peritoneal e cada ponto representa a média de 5 animais \pm os E.P.M. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas. * P < 0,05 ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

4.1.3 Efeito do extrato de própolis P1 (v.o) ou (i.p.) ou Artepillin C (i.p) sobre a pleurisia induzida por carragenina

Para avaliar se o efeito antiinflamatório da própolis se dava também através da absorção sistêmica, utilizamos a indução inflamatória na cavidade pleural, pleurisia. Neste modelo, o tratamento dos animais com o extrato padronizado de própolis P1 (10 mg/Kg, v.o) não produziu redução significativa da resposta inflamatória causada pela carragenina. Entretanto, nas doses de 30 ou 100 mg/Kg observou-se inibição significativa do total de células presentes no lavado pleural

($31\pm 2\%$ ou $58\pm 3\%$, respectivamente) (Figura 10A), com uma DI_{50} estimada de 67 (63-69 mg/Kg). Da mesma forma, a dexametasona (0,5 mg/Kg, i.p.) 4 h antes, inibiu em $85\pm 5\%$ o total de leucócitos presentes no lavado pleural (Figura 10A).

O tratamento dos animais com o extrato de própolis P1 (1 mg/Kg i.p, 30 min antes) não alterou significativamente a resposta inflamatória induzida pela carragenina na pleura. Todavia, o aumento da dose para 3 e 10 mg/kg, i.p., 30 min antes, produziu inibição do total de leucócitos no lavado peritoneal de $30\pm 3\%$ e $60\pm 4\%$, respectivamente, com uma DI_{50} estimada de 6,6 (5,5-7,7 mg/Kg) (Figura 10B). A dexametasona (0,5 mg/Kg s.c.) 4 h antes do experimento, produziu redução significativa de $83\pm 3\%$. (Figura 10B).

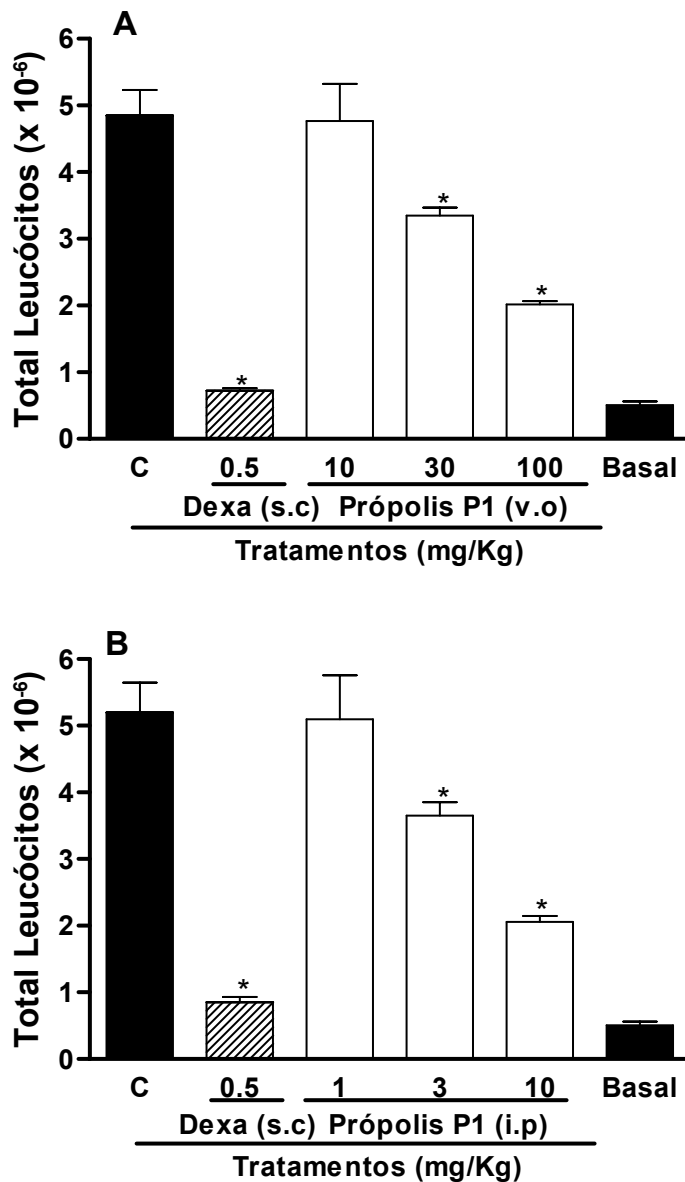


Figura 10: Efeito do tratamento com salina (C), dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) ou própolis P1 (10, 30 ou 100mg/kg, via oral) (A) ou (1, 3 ou 10 mg/Kg, i.p.) (B), sobre o total de células presentes no lavado pleural dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 µg/cavidade). Os resultados estão expressos como o aumento do número de células no lavado pleural e cada ponto representa a média de 5 animais ± os E.P.M. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes. * P < 0,05 ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

No mesmo modelo da pleurisia, o tratamento dos animais com Artepillin C (0,1 mg/Kg, i.p.) 30 min antes, não produziu redução significativa das respostas inflamatórias induzidas pela carragenina (Figura 11). No entanto, nas doses de 1 ou 10 mg/Kg, i.p, (30 min antes) o Artepillin C produziu inibição do total de leucócitos no

lavado pleural ($65,0 \pm 3,2$ ou $78,9 \pm 4,1\%$) com DI_{50} estimada de: 1,6 (1,2-2,0 mg/Kg) (Figura 11). O tratamento dos animais com a dexametasona (0,5 mg/Kg, s.c., 4 h antes) produziu redução média de $73 \pm 3\%$ da migração celular em resposta à ação da carragenina (Figura 11).

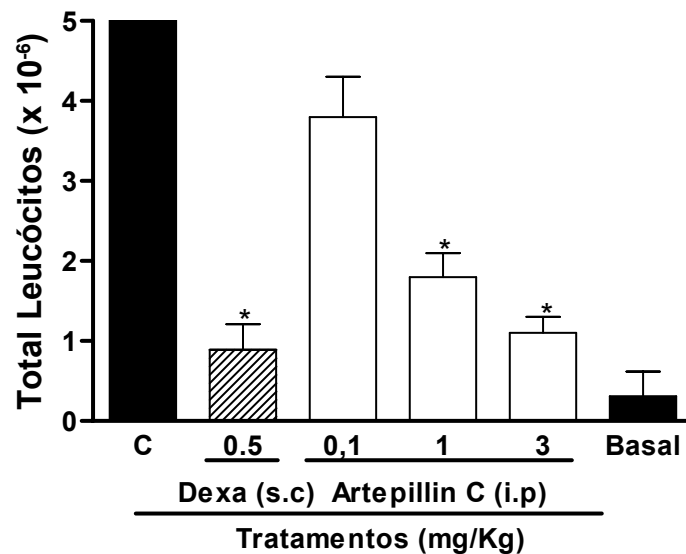


Figura 11: Efeito do tratamento com salina (C), dexametasona (0,5 mg/Kg s.c) ou Artepillin C (0,1, 1 ou 10mg/kg, via i.p.) sobre o total de células presentes na cavidade pleural dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 μ g/cavidade). Os resultados estão expressos como o aumento do número de células no lavado pleural e cada ponto representa a média de 5 animais \pm os E.P.M. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes. * $P < 0,05$ ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

4.1.4 Efeito da Própolis P1 e do Artepillin C sobre os níveis de Prostaglandina E_2 no lavado peritoneal:

A carragenina injetada i.p. produziu recrutamento intenso e ativação de leucócitos, especialmente neutrófilos (nas primeiras 4 h após o tratamento) dentro da cavidade peritoneal e subsequente elevação dos níveis teciduais de prostaglandina E_2 (Figura 12). O tratamento dos animais com própolis (10, 30 ou 100 mg/Kg, v.o.)

produziu redução dependente da dose nos níveis de PGE₂ presentes no lavado peritoneal (30±2%, 62±3% e 83±2%, respectivamente) com uma DI₅₀ estimada de 23,8 (14,1-25,7) mg/Kg (Figura 12A). Por outro lado, o Artepillin C (1 ou 10 mg/Kg, i.p.) 30 min antes, reduziu o conteúdo de PGE₂ no lavado peritoneal em 41,0±3,8 e 66,4±4,2%, respectivamente (Figura 12B). A DI₅₀ encontrada para este efeito foi de 4,4 (3,7-5,0) mg/Kg.

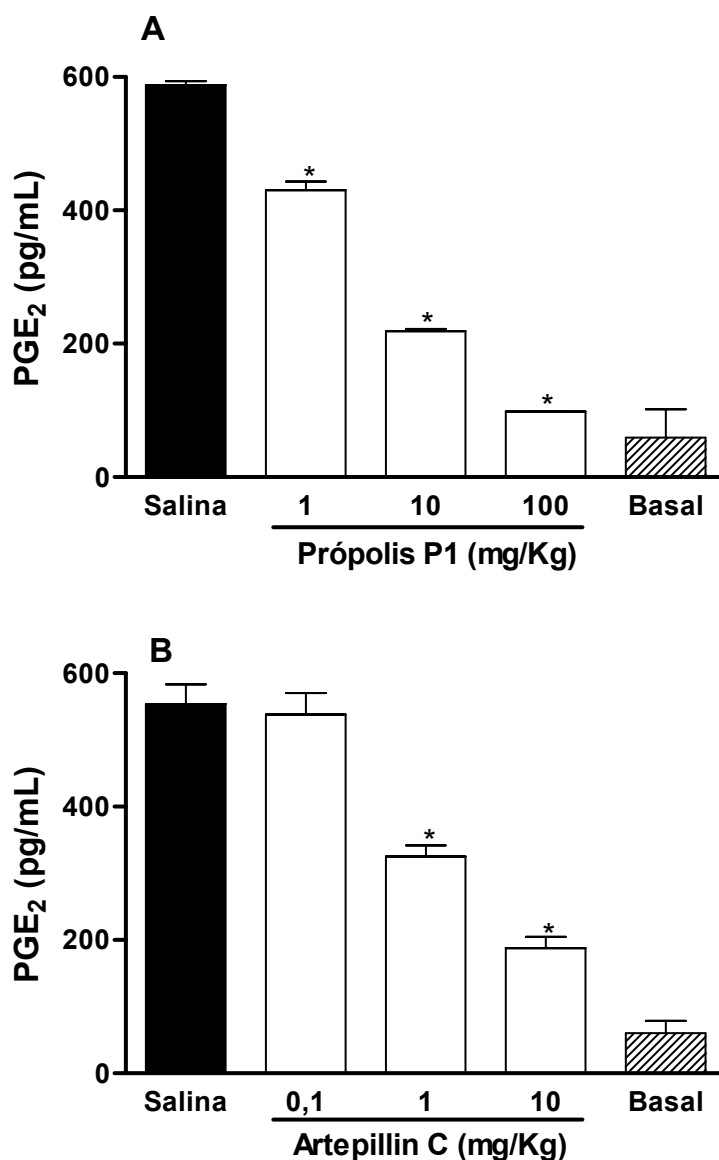


Figura 12: Efeito do pré-tratamento com salina, com a própolis P1 (1, 10 ou 100 mg/Kg, v.o) (A), ou com o Artepillin C (B) 0,1, 1 ou 10 mg/kg, via i.p. sobre o aumento dos níveis de PGE₂ no lavado peritoneal dos animais tratados com carragenina (Cg, 100 µg/cavidade). Os resultados estão expressos em pg/ml e cada ponto representa a média de 5 amostras ± os E.P.M. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes. * P < 0,05 ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

4.1.5 Efeito da própolis P1 sobre a atividade da óxido nítrico sintase endotelial em células endoteliais vasculares humanas (EA.HY926)

Para investigar o possível efeito do extrato de própolis P1 sobre a produção de óxido nítrico dependente da eNOS e sobre a expressão dessa enzima, células EA.hy926 foram incubadas com própolis P1 (100, 300 ou 500 $\mu\text{g/mL}$, por 18 h). O forbol-12-miristato-13acetato (PMA) (2 nmol/L, por 18 h) produziu aumento significativo da atividade relativa da enzima e-NOS para $1,67 \pm 0,17$ vezes em relação ao grupo controle. Esse resultado foi acompanhado de aumento da expressão da e-NOS analisado através do método de Western blot e avaliado por densitometria das bandas de imunoprecipitação. Nessas condições a própolis P1 não foi capaz de alterar significativamente a expressão ou atividade da eNOS. (Figura 13).

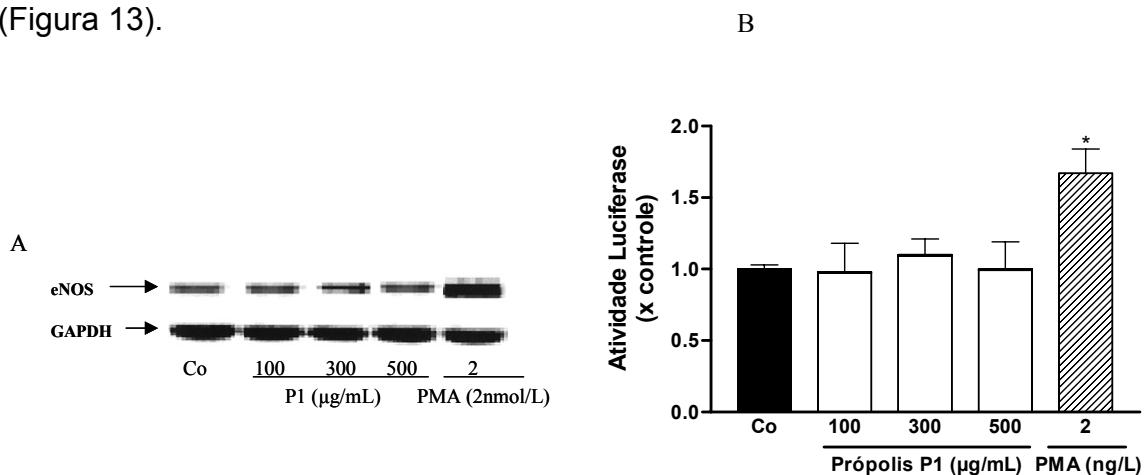


Figura 13: Efeito da incubação de própolis P1 ou do forbol miristato acetato sobre a atividade ou a expressão da eNOS in endothelial cells (EA.hy926) por 18 h. (A) Western blot para a detecção de eNOS e proteína GAPDH. (B) Células EA.hy926 foram estimulados com concentrações crescentes de própolis P1 (100, 300 ou 500 $\mu\text{g/mL}$) ou com PMA 2nmol/L por 18 horas. Os dados são representados como média \pm SD de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ (ANOVA/Dunnett).

4.1.6 Efeito da Própolis P1 e do Artepillin C sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7):

A cultura celular de macrófagos RAW 264.7 apresentou produção basal de NO de cerca de 5 μM . A exposição das células RAW 264.7 ao LPS (1 $\mu\text{g/mL}$, 20 h) resultou em aumento marcante para $54,4 \pm 5,9$ μM dos níveis de nitrito no sobrenadante celular. A pré-incubação dos macrófagos, 30 min antes, com a própolis P1 (10, 30 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) reduziu de forma significativa a concentração de nitrito para $50,2 \pm 4,7$ μM , $36,8 \pm 4,7$ μM e $7,8 \pm 3,5$ μM , respectivamente. A CI_{50} estimada foi de 51,8 (45,5-58,1) $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14A). Ao contrário do Artepillin C que na concentração de 1 μM não reduziu significativamente os níveis de NO em RAW 264.7. Entretanto, quando suas concentrações foram aumentadas para 3, 10 ou 100 μM , a produção de NO foi inibida em $28,0 \pm 3,1$, $61,2 \pm 2,8$ ou $66,7 \pm 3,4\%$, respectivamente (Figura 14B). A CI_{50} encontrada para o efeito inibitório do Artepillin C sobre a produção de NO em macrófagos murinos (RAW 264.7) foi de 6,8 (5,7-7,4) μM .

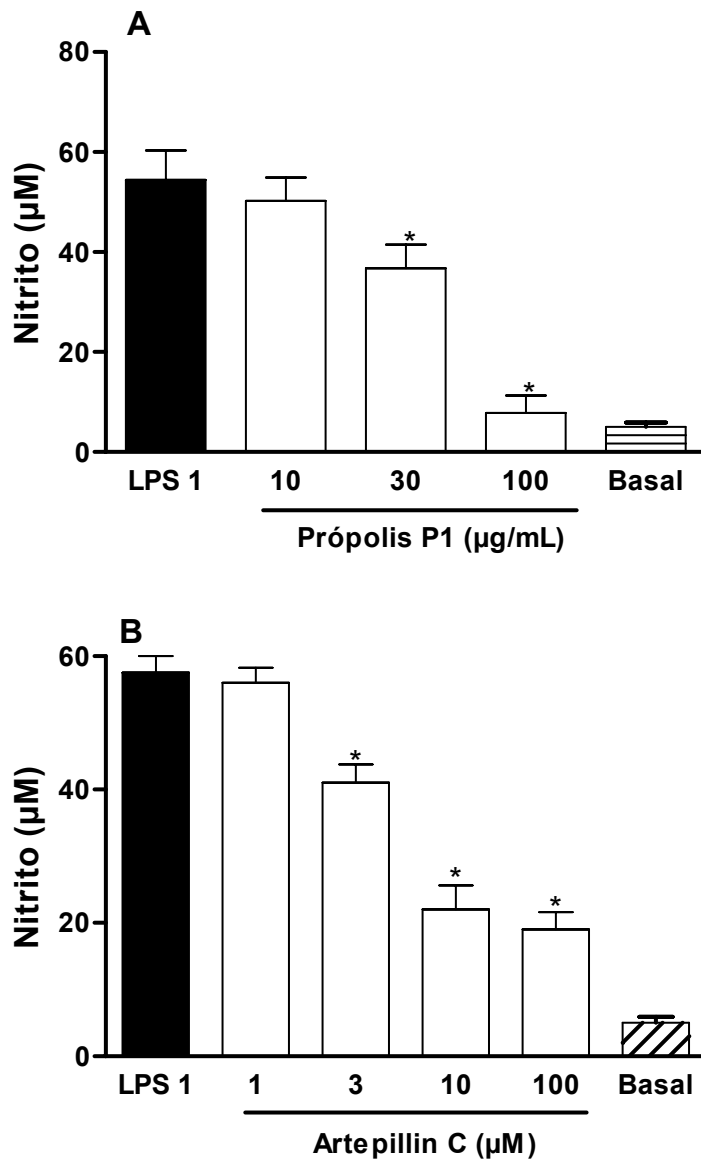


Figura 14: Efeito do tratamento com veículo (LPS1), própolis P1 (10, 30 ou 100 µg/ml) (A) ou do Artepillin C (B) (1, 3, 10 ou 100 µM) sobre o acúmulo de nitrito no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS (1 µg/mL) por 20 h. Os resultados correspondem à média de três experimentos \pm E.P.M. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes. * $P < 0,05$ (ANOVA/Dunnett).

Em todos os grupos experimentais não houve alteração significativa da viabilidade celular, com exceção da maior concentração de própolis (300 µg/mL) quando analisada pelo método do MTT (Figura 15).

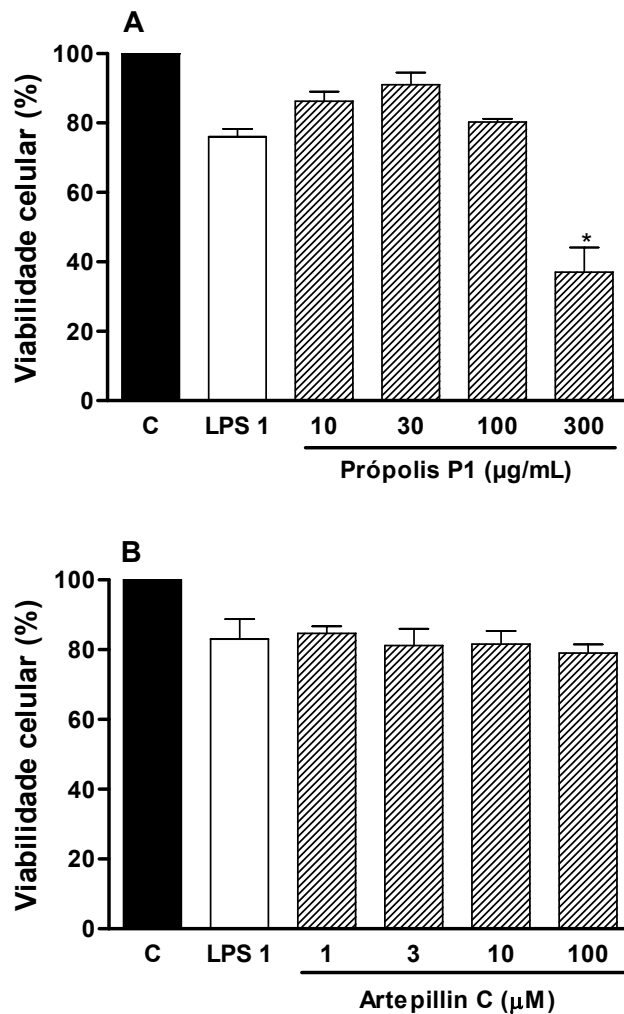


Figura 15: Efeito do tratamento com LPS (1 µg/mL) na ausência ou na presença de própolis P1 (10, 30, 100 ou 300 µg/ml) (A) ou do Artepillin C (B) (1, 3, 10 ou 100 µM) sobre a viabilidade celular em RAW 264.7 medida pelo MTT. Os resultados correspondem à média de três experimentos ± E.P.M. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes. * P < 0,05 quando comparados com os respectivos valores controle no teste *t* de Student.

4.1.7 Efeito do extrato de própolis P1 sobre a expressão da p-38 MAPK em células de músculo liso vascular.

A incubação de própolis P1 (10, 30 ou 300 µg/mL) produziu aumento significativo da expressão da p-38 MAPK de 28±3, 107±6 e 147±7%, respectivamente, em relação ao efeito produzido pela incubação de angiotensina II

(100 nM) na ausência do extrato P1. A expressão da p-38 MAPK foi detectada através do método de Western blot, e a resposta foi representada pela densitometria das bandas em relação ao grupo controle (Figura 16).

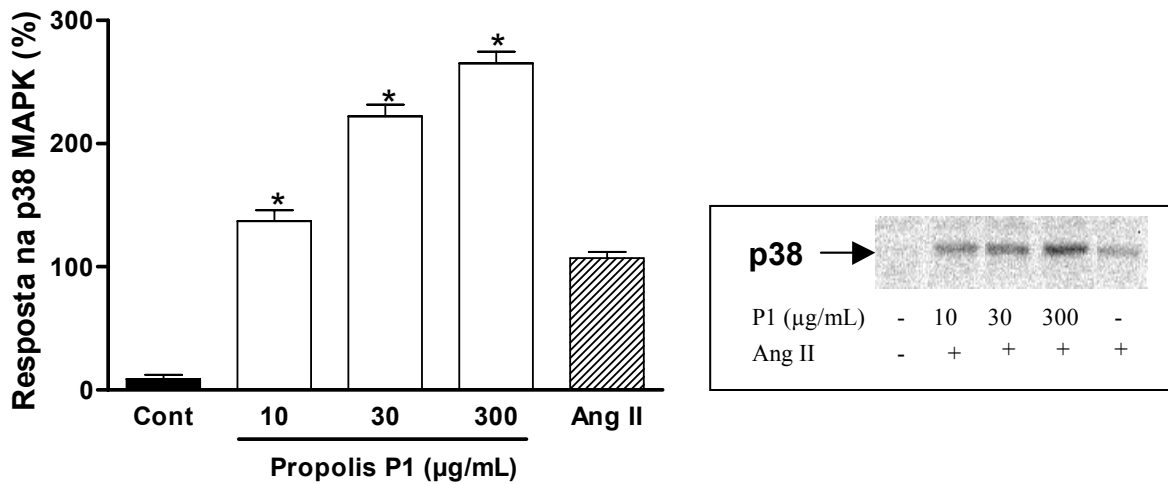


Figura 16: Efeito da incubação de própolis P1 (30, 100 ou 300 µg/mL) ou da angiotensina II (100 nM) sobre a expressão da p-38 MAPK em cultura primária de células musculares lisas vasculares de aorta de rato. Ao lado, Western blot para a detecção de p38 MAPK. Os dados são representados como média ± EPM de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. * P < 0.05 (ANOVA/Dunnett).

4.1.8 Efeito da própolis e do Artepillin C sobre a atividade do NFκB (Ensaio da Luciferase)

A pré-incubação das células de rim embrionário humano (HEK293), transfectadas com o gene de expressão do NFκB, com extrato de própolis P1 (10 µg/mL) ou com o Artepillin C (10 µM), não afetou significativamente a ativação do NFκB. No entanto, a incubação de P1 (30 ou 100 µg/ml) produziu redução significativa de 27,0±5,1 e 83,0±3,1%, respectivamente, da atividade específica do NFκB. Por outro lado, o Artepillin C (30 ou 100 µM) reduziu a atividade específica do

NF κ B em $23\pm 5,2$ e $56\pm 3,4$, respectivamente. A CI_{50} para o extrato de própolis P1 foi de $43,2$ ($40,2-46,0$) $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para o Artepillin C foi de $89,0$ ($77,1-98,1$) μM . O inibidor específico do NF κ B, MG132 ($10 \mu\text{M}$) produziu inibição de $89,0\pm 3,0\%$ (Figura 17).

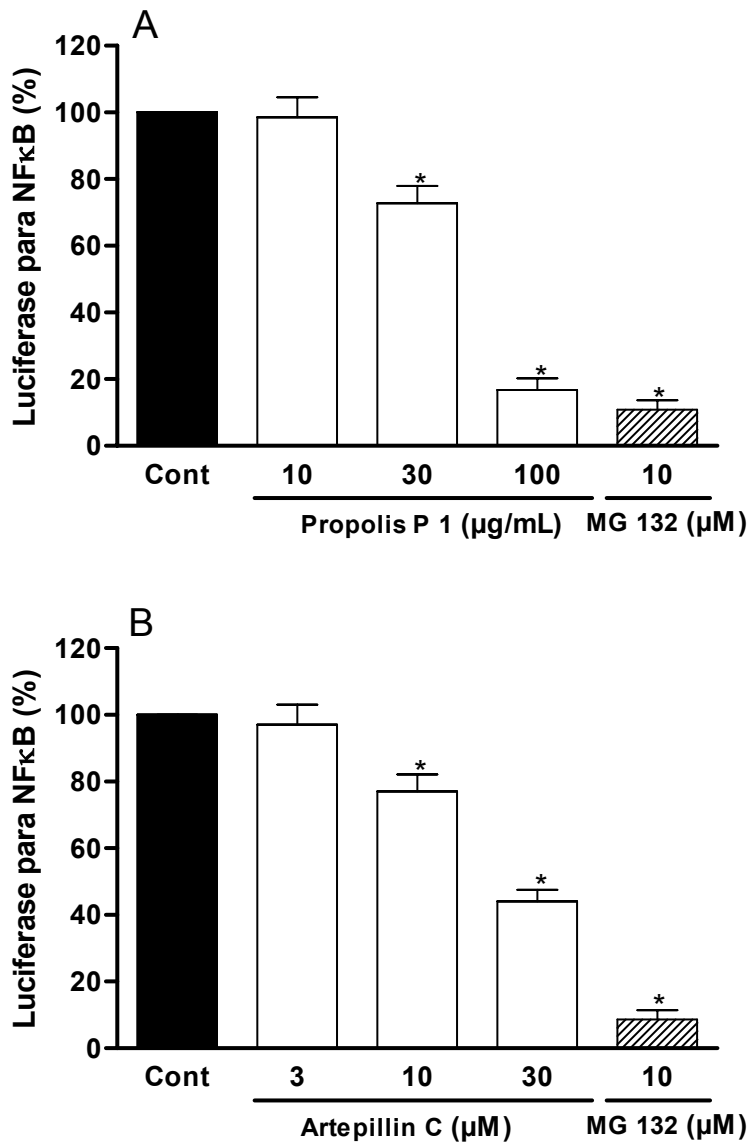


Figura 17: Efeito do tratamento com TNF α (Cont) ou com TNF α + extrato de própolis P1 (10, 30 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) ou MG132 (10 μM) (A) ou com TNF α + Artepillin C (10, 30 ou 100 μM) sobre a atividade do NF κ B em células de rim embrionário humano (HEK293). Cada ponto representa a média de cinco experimentos individuais e as linhas verticais os EPM. Os asteriscos indicam a diferença estatisticamente significativa. * $P < 0,05$ (ANOVA/Dunnett).

4.2 Avaliação da Biodisponibilidade do Artepillin C

A avaliação cromatográfica das amostras de sangue dos camundongos que receberam própolis P1 (100 mg/Kg, v.o.) demonstrou que a cinética de absorção do Artepillin C, a partir do consumo de própolis pela via oral, é significativa depois dos primeiros 30 min. Conforme demonstrado na figura (18A), o pico de absorção máxima do Artepillin C nos camundongos tratados foi de 7,1 $\mu\text{g/ml}$ de plasma analisado no tempo de 2 h. Todavia, essa concentração não diferiu significativamente das concentrações encontradas 1 h ou em 30 min após a administração de P1 (Figura 18A).

O curso temporal de absorção de Artepillin C decai rapidamente quando avaliado 24 h após a administração de P1. Nossos resultados demonstraram que a biodisponibilidade do Artepillin C, a partir da amostra de extrato de própolis P1 administrado oralmente, foi de cerca de 25%, quando analisamos a concentração plasmática máxima de Artepillin C em relação à quantidade dele presente no extrato de própolis P1 administrado aos camundongos.

Quando os animais foram tratados com a solução de Artepillin C (10 mg/kg, v.o.), a concentração máxima encontrada na corrente sanguínea foi de 20, 22 e 17 $\mu\text{g/ml}$ nos tempos de 30 min, 1 ou 2 h, respectivamente, sugerindo uma biodisponibilidade de 19 % para o Artepillin C (Figura 18B).

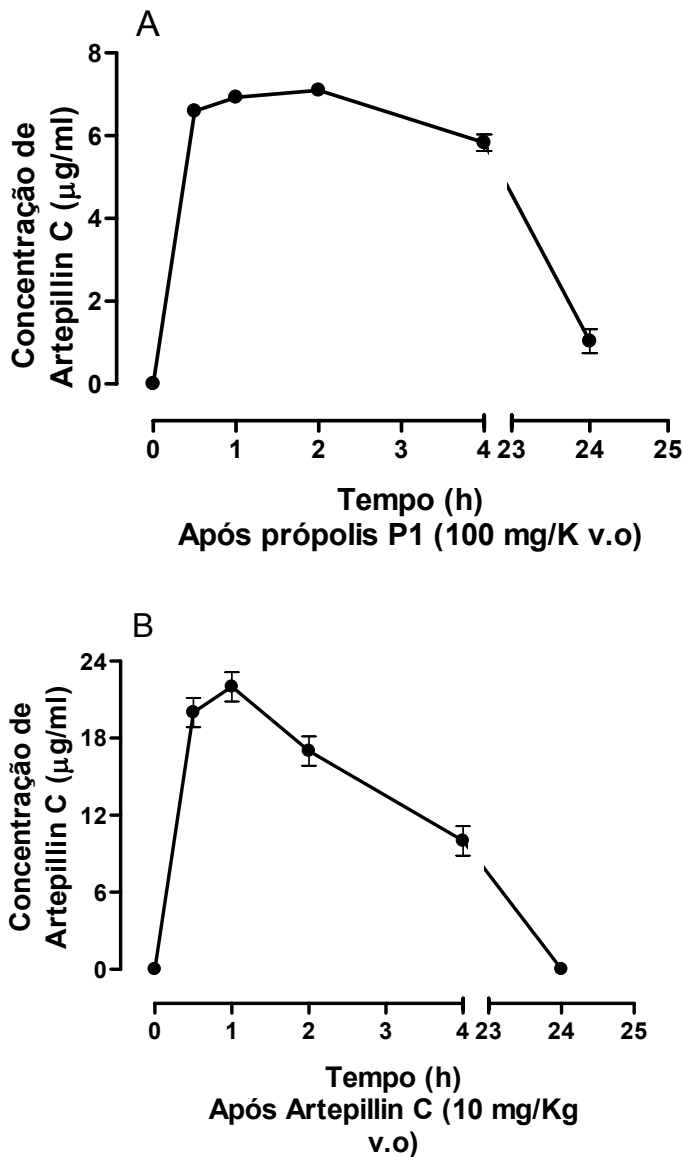


Figura 18: Curso temporal de absorção do Artepillin C pela via oral após administração de própolis P1 (100 mg/Kg) ou solução de Artepillin C (10 mg/Kg). Os resultados representam os picos de concentração plasmática de Artepillin C após o tratamento nos vários intervalos de tempo analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os ensaios foram realizados em triplicata. Cada ponto representa a média das três leituras realizadas nos respectivos tempos.

Estudos preliminares foram realizados com o padrão do composto Artepillin C, injetando-se uma solução metanólica de Artepillin C (100 µg/mL (ppm) em varredura de ions (SCAN) para avaliar a resposta cromatográfica e a fragmentação característica do composto. Além disso, essa injeção preliminar serviu para avaliar qualitativamente a pureza do padrão do Artepillin C. O cromatograma

total de ions (*TIC*, do inglês *Total Ion Chromatogram*) pode ser observado na figura 19.

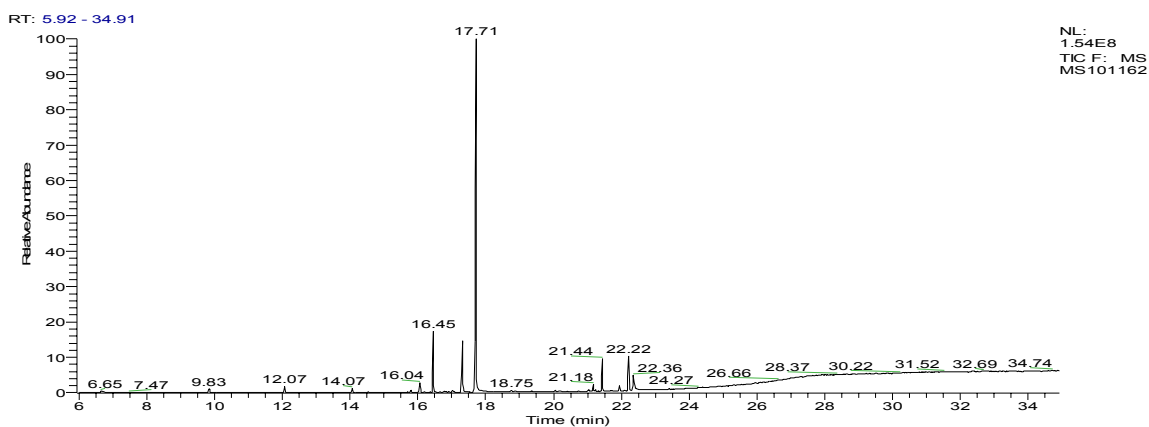


Figura 19: O *TIC* do padrão de Artepillin C com concentração de 100 µg/mL.

Foi observado a presença de um pico majoritário com tempo de retenção de 17,71 min, que se concluiu ser o composto de interesse. O espectro de massas do pico majoritário pode ser visto na figura 20.

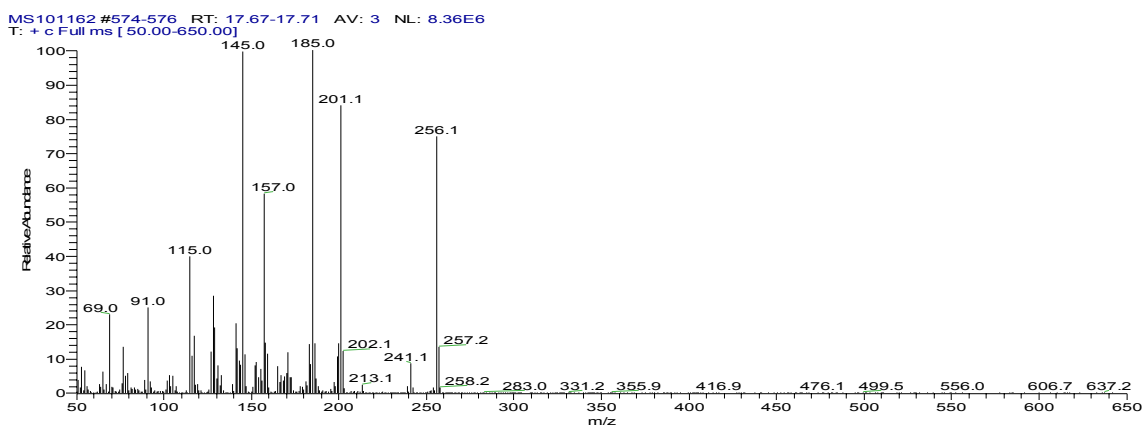


Figura 20: Espectro de massas do pico majoritário da padrão analisado.

A fim de padronizar um método com uma sensibilidade maior, escolheu-se os ions mais abundantes do Artepillin C. Os ions m/z 145, 185, 201 e 256 foram selecionados para serem avaliados num método seletivo de monitoramento de íons (*SIM*). O composto D14-Terfenil foi escolhido como padrão interno a ser utilizado

para monitorar o Artepillin C. Os íons selecionados do D14-Terfenil foram os m/z 244, 212 e 122.

O Artepillin C apresenta dois grupamentos funcionais, um grupo ácido carboxílico e um grupo fenol. Esses dois grupamentos, que apresentam hidrogênio ativo, podem interagir por adsorção com a fase estacionária da coluna cromatográfica piorando a resposta analítica do composto. Analisou-se a reatividade do Artepillin C frente ao derivatizante N,N-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA). O pico identificado anteriormente como sendo a Artepillin C não desapareceu, indicando que a formação do trimetilsilil derivado não tinha sido completa, provavelmente, pela presença de dois grupamentos aquil volumosos adjacentes a posição fenólica do anel aromático.

Isso permitiu que a curva de calibração do Artepillin C fosse feita sem derivatização. Na figura 21 pode ser observada o *TIC* em varredura de ions da solução de concentração 100 µg/mL submetida a reação com BSTFA.

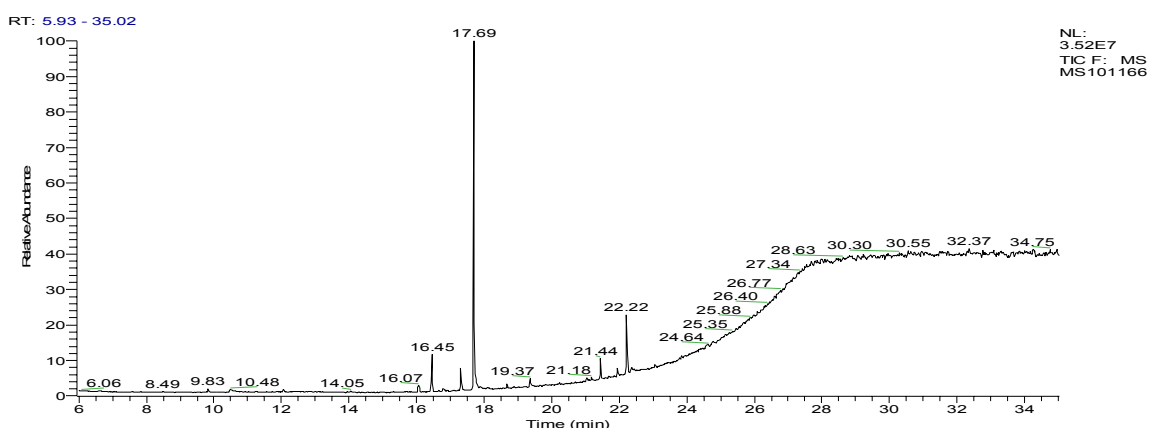


Figura 21: O *TIC* da solução de concentração 100 µg/mL submetida à reação com BSTFA.

Quando analisados em cromatografia gasosa, as características dos dados farmacocinéticos confirmaram os dados obtidos anteriormente por HPLC sugerindo valores similares para a absorção do Artepillin C pela via oral (Figura 22).

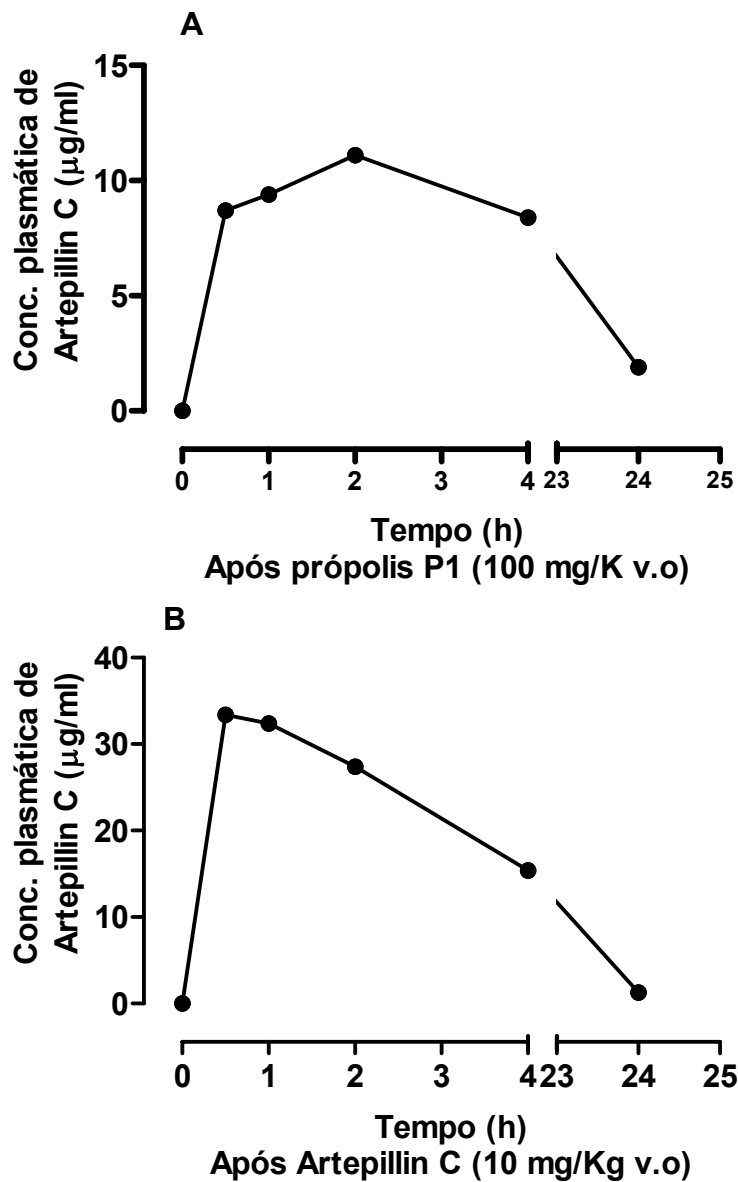


Figura 22: Curso temporal de absorção do Artepillin C pela via oral após administração de própolis P (100 mg/Kg) ou solução de Artepillin C (10 mg/Kg). Os resultados representam os picos de concentração plasmática de Artepillin C após o tratamento nos vários intervalos de tempo analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG massa). Os ensaios foram realizados em triplicata.

5 DISCUSSÃO

A própolis tem sido utilizada na medicina popular principalmente na Europa desde a idade média para o tratamento de inúmeras doenças, especialmente aquelas relacionadas à presença de microorganismos, infecções, e para o alívio e tratamento de doenças inflamatórias decorrentes de inúmeros fatores. Todavia, o estudo sistemático de seus efeitos e os mecanismos envolvidos em suas ações antiinflamatórias, passou a ser mais amplamente estudado somente a partir da década de 90.

Mirzoeva e Calder (1996) demonstraram que a própolis europeia e o seu principal constituinte ativo, o fenetil éster do ácido caféico (CAPE), inibiram a produção de prostaglandinas e de leucotrienos em macrófagos murinos ativados durante a inflamação peritoneal induzida por zimozan. Efeito similar já havia sido demonstrado por Ivanovska (1995), usando a fração hidrossolúvel da própolis administrada pelas vias i.p. ou v.o, bem como por Khayyal et al, (1993) em preparações de pulmão humano, nas quais a incubação de própolis reduziu a produção de prostaglandinas, leucotrienos e de histamina. Park et al. (1999) demonstraram o efeito antiinflamatório do extrato de própolis nas doses entre 50 e 100 mg/Kg/dia via oral, quando analisado em vários modelos animais de inflamação aguda e crônica. Ação semelhante foi também observada para 14 preparações

comerciais de própolis brasileira quando avaliada no modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (MENEZES et al, 1999).

Analisando os constituintes químicos presentes na própolis oriunda da Itália, Borrelli et al (2002) demonstraram que o CAPE e a galangina são os principais componentes da própolis européia (italiana) e que a própolis e o CAPE, mas não a galangina, apresentam atividade antiinflamatória quando avaliado nos modelos de edema de pata induzidos pela carragenina, bem como na pleurisia e na artrite induzidas pelo adjuvante de Freund. Em um outro estudo, foi demonstrado que a fração aquosa da própolis oriunda da Coreia, com constituição química semelhante à européia, era capaz de aumentar a atividade de macrófagos murinos (RAW 264.7) e a conseqüente produção de óxido nítrico e da citocina TNF alfa (HAN et al, 2002). De fato, a fração aquosa da própolis contém constituintes substancialmente diferentes daqueles extraídos na fração etanólica. Na fração aquosa, os principais constituintes são os derivados do ácido cafeoil quínico e do ácido gálico, como algumas catequinas, enquanto que na fração etanólica são extraídos, preferencialmente, os fenólicos como os flavonóides (BANKOVA, 2005).

Investigando os possíveis mecanismos vasculares para a ação antiinflamatória da própolis, Song et al (2002) demonstraram que a própolis e o CAPE apresentam efeitos antiangiogênicos reduzindo a proliferação de células vasculares endoteliais. Esses mesmos autores sugeriram também que a inibição da proliferação celular vascular pode contribuir para o efeito antiinflamatório descrito para a própolis, impedindo com isso o extravasamento plasmático (edema) e a migração de leucócitos. Esse mecanismo vascular pode estar relacionado com a ação da própolis sobre a enzima p38 MAPK. De fato, Lee et al (2003) demonstraram que o CAPE, principal constituinte isolado da própolis européia, é capaz de inibir a

proteína supressora de tumor p53, sobre células de glioma C6. Foi demonstrado ainda que o CAPE aumenta em cerca de 24% a proporção de núcleos diplóides 36 h após o tratamento com 50 μ M CAPE, aumentando a liberação de citocromo C das mitocôndrias e levando à apoptose das células tumorais em glioma (C6). Esse efeito parece ser mediado pela ativação da Erk2 e da p38 MAPK, com conseqüente supressão da atividade da p53, proteína supressora de tumor e da Bax (LEE et al, 2003).

Outros estudos demonstraram que o CAPE foi efetivo em prevenir o estresse inflamatório em cultura de células hipocâmpais (MONTPIED et al, 2003). Neste trabalho foi demonstrado que a incubação do CAPE nas culturas de células hipocâmpais submetidas à indução inflamatória com LPS, ele foi capaz de prevenir a transativação do fator nuclear NF κ B e reduzir a expressão da nNOS e a produção de óxido nítrico. Esses efeitos foram acompanhados de aumento da atividade do elemento de resposta de ligação do cAMP ao DNA (CREB), que possui relevante papel inibidor da resposta inflamatória. A partir desses estudos, foi sugerido que a própolis européia e alguns de seus constituintes são efetivos em reduzir a expressão e síntese de citocinas, mas induzem a produção de TGF beta 1 em células imunes humanas (ANSORGE et al, 2003). As produções das citocinas IL-1 beta e IL-12 em populações de monócitos/macrófagos, IL-2 em células Th1 e IL-4 em células Th2 são praticamente abolidas na presença de própolis e de alguns de seus constituintes, enquanto que a produção de TGF-1 beta em linfócitos T regulatórios é aumentada. Ansorge et al (2003) demonstraram que esses efeitos são decorrentes, pelo menos em parte, da modulação da via de sinalização associada à Erk-2 MAP quinase.

De fato, a própolis e seus constituintes parecem modular elementos intracelulares de resposta fosforilativa como demonstrado recentemente por Woo et al, (2004), que observaram que a apoptose induzida por crisina, presente na própolis européia e brasileira, é mediada através da ativação do sistema das caspases e inativação da Proteína Quinase B (PKB/Akt) em células leucêmicas U937. Tais resultados sugerem que a crisina pode ser uma ferramenta importante para o tratamento de patologias relacionadas a malignidade de células hematológicas (WOO et al, 2004).

Além disso, os mesmos autores demonstraram que a crisina suprime a expressão da enzima COX-2 induzida por LPS através da inibição da atividade do fator de transcrição nuclear específico para a IL-6 (NF-IL6) e a sua conseqüente ligação ao DNA, apontando um novo mecanismo para a ação antiinflamatória e anticarcinogênica da crisina (WOO et al, 2005). Rezzani et al (2005) demonstrou que o CAPE é capaz de proteger o efeito cardiotoxico induzido pela ciclosporina, bem como de inibir a atividade e expressão de metaloproteinases MMP2 e TIMP.

Koksel et al (2005) demonstraram que o CAPE foi efetivo na redução da inflamação e do dano de tecido pulmonar induzido por LPS em ratos, protegendo os animais do estresse oxidativo gerado pela aplicação do LPS. Esse efeito preventivo também foi demonstrado recentemente por Kuo et al (2005), que demonstraram que o CAPE inibiu o crescimento de células tumorais de glioma C6, sendo esse efeito, em parte, decorrente da inibição das enzimas que regulam o ciclo celular G0/G1, reduzindo assim o número de células mitóticas e a diferenciação celular no glioma C6.

Recentemente, Shieh et al (2005) demonstraram que o CAPE e alguns derivados cinâmicos são capazes de aumentar a condutância de canais de potássio

(BKCa) em queratinócitos da cavidade bucal. Esse efeito potencializa a expressão celular e melhora a barreira epitelial antimicrobiana. Esses resultados estão de acordo com nosso trabalho em traquéia isolada de cobaia (PAULINO et al, 2002), no qual demonstramos que a própolis padronizada do sul do Brasil induz relaxamento da musculatura lisa traqueal através de mecanismos relacionados à ativação direta ou indireta de canais de potássio modulados por cálcio de alta condutância (BKCa).

Apesar da grande diversidade de artigos relatando as ações da própolis européia e as demonstrações de que o fenetil éster do ácido caféico (CAPE) e, mais recentemente, a crisina são os principais responsáveis pela maioria das ações antiinflamatórias.

Poucos estudos têm analisado quais constituintes químicos presentes na própolis do Brasil seriam responsáveis pela atividade antiinflamatória desse extrato.

Diferentemente da própolis européia, os estudos químicos realizados com a própolis brasileira têm demonstrado quantidades muito pequenas de CAPE, e, portanto, esse marcador químico não pode ser utilizado com segurança para a avaliação dos efeitos farmacológicos demonstrados para as amostras de própolis oriundas do Brasil.

O presente estudo avançou substancialmente com relação às propriedades antiinflamatórias da própolis brasileira e forneceram evidências através de estudos *in vitro* e *in vivo* com relação ao seu provável mecanismo de ação. Foi demonstrado neste estudo, de maneira bastante clara, que o Artepillin C é um dos principais constituintes ativos presentes na própolis P1 responsável pelas suas propriedades antiinflamatórias. Os resultados do presente estudo demonstraram também que o tratamento dos animais com própolis P1 produziu efeito

antiedematogênico e antiinflamatório nos modelos do edema de pata, peritonite e pleurisia induzidas pela carragenina.

Esses resultados estão de acordo com os dados publicados por Borrelli et al (2002), para amostras de própolis européia, e de acordo com o artigo recentemente publicado por Hu et al (2005) utilizando extrato de própolis da China, que demonstraram que tanto os extratos etanólicos quanto os extratos metanólicos apresentaram efeitos antiinflamatórios em modelo de edema de pata, pleurisia induzidos pela carragenina e que esses efeitos estão parcialmente relacionados à inibição da produção de PGE₂ e de óxido nítrico em populações de macrófagos. Além disso, os autores apontam que, em modelo de artrite induzida pelo Adjuvante de Freund, o tratamento dos animais com própolis da China inibiu a produção de IL-6, mas não alterou as produções de IL2 ou Interferon gama.

Na verdade, o processo inflamatório é desencadeado pela liberação de mediadores químicos originários dos tecidos lesados, do endotélio vascular e das células inflamatórias (RANKIN 1996; SERHAN; CHIANG, 2004). Dentre os principais mediadores do processo inflamatório identificados, encontram-se: aminas vasoativas (histaminas e serotonina), eicosanóides (metabólitos do ácido araquidônico - prostaglandinas e leucotrienos), fator agregação plaquetária (PAF), citocinas (interleucinas e TNF α), cininas (bradicinina), neuropéptídeos (Substância P, Neurocinina A e B, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP)), sistema do complemento, radicais livres de oxigênio, entre outros (CZERMAK et al, 1998; OHISHI, 2000), e mais recentemente algumas quimiocinas e seus receptores (CXCR3, CCR5, CCR3, CCL11, CCL17, CXCL9, CXCL10) (CAMPBELL et al, 2002, CHENG et al, 2005). Essas substâncias são produzidas pelas células inflamatórias, que incluem os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilo, eosinófilo, basófilo), as

células endoteliais, mastócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos (FIALA et al, 2002).

Em recente publicação, nosso grupo demonstrou que a própolis europeia (Bulgária) apresentou efeito analgésico e antiinflamatório em modelos de dor e inflamação aguda reduzindo a sensibilidade dolorosa, além do edema e da migração de células inflamatórias associadas à aplicação de agentes pró-inflamatórios (PAULINO et al, 2003).

Estudos recentes demonstraram que a própolis verde do Brasil, oriunda da região sudeste, apresentou efeito neuroprotetor *in vitro* e *in vivo* contra o dano neuronal induzido por evento isquêmico inflamatório. Esse efeito foi claramente dependente da atividade antioxidante do extrato da própolis brasileira (SHIMAZAWA et al, 2005). Da mesma forma, a própolis brasileira foi capaz de induzir apoptose em células HL-60 em parte pela modulação da expressão gênica. Mishima et al (2005) demonstraram que a própolis brasileira inibiu a expressão de uma proteína ligante de cálcio e de proteínas pró-inflamatórias.

Nossos resultados são consistentes com esses dados descritos na literatura e demonstram que a própolis do sul do Brasil (P1) possui efeito antiinflamatório por mecanismo associado à inibição da atividade leucocitária, que parece ser em grande parte mediada através da inibição do NF κ B. Além disso, esse efeito antiinflamatório está associada à redução da produção de prostaglandina E₂ e da inibição da produção de óxido nítrico. Nossos resultados demonstram ainda que a própolis brasileira (P1) é capaz de modular a ativação da p38-MAPK em células músculos lisos vasculares humanas, podendo dessa forma, contribuir para aumentar a diferenciação celular e a resistência vascular.

Tem sido descrito na literatura que durante a fase aguda da inflamação o principal fenômeno inicializador deste processo é a produção local de prostaglandinas (especialmente a PGE₂) e de leucotrienos derivados do ácido araquidônico. PGE₂ é, relativamente, seletiva na interação com vários subtipos de receptores, como por exemplo EP₁, EP₂, EP₃, ou EP₄, como demonstrados em preparações de tecidos isolados (COLEMAN et al, 1994; HATA; BREYER 2004), e é também responsável pela modulação da resposta edematogênica e pela formação de exudato pleural, mas não pelo recrutamento de leucócitos na inflamação induzida pela carragenina (YUHKI et al, 2004).

O ácido araquidônico, um precursor de eicosanóides, incluindo prostanóides derivados da via da ciclooxigenase e de leucotrienos derivados da via da lipooxigenase, é estocado na posição *sn*-2 dos glicerofosfolípídeos da membrana e é liberado pela ação hidrolítica de enzimas do grupo da fosfolipase A₂. Pelo menos dezenove tipos de fosfolipase A₂ já foram identificadas em mamíferos como a citosólica (cPLA₂), secretória (sPLA₂) e cálcio independente (iPLA₂) e todas estão envolvidas na produção de eicosanóides (MURAKAMI; KUDO, 2001; KUDO; MURAKAMI, 2002). O ácido araquidônico é metabolizado para um intermediário instável, PGH₂, por ação da COX e então para vários prostanóides por enzimas sintases específicas, como a PGE sintase (PGES), que converte PGH em PGE₂. Esse prostanóide atua sobre receptores específicos e têm sido identificados em vários tecidos contribuindo decisivamente para as ações da PGE₂ em eventos como a regulação de algumas funções neuronais (via EP₁), reprodução em fêmeas, hipertensão vascular e gênese de tumores (via EP₂), febre, proteção da mucosa gástrica, dor, hipersensibilidade, controle da função renal e resposta alérgica (via EP₃), constrição de esfíncteres arteriolares e reabsorção celular na medula óssea

associada à inflamação (via EP4) (SUGIMOTO, 2000). Desde que a superprodução de PGE₂ está frequentemente associada com várias doenças, a compreensão das propriedades, funções e regulação da rota de biossíntese da PGE₂ é essencial (MURAKAMI; KUDO, 2004)

De fato, o presente estudo demonstra que tanto a própolis P1 quanto o Artepillin C reduziram a produção de prostaglandina E₂ durante a inflamação peritoneal induzida pela carragenina.

Outro mediador químico, que poderia estar relacionado com as ações antiinflamatórias da própolis, é o óxido nítrico (NO). Ele foi primeiramente identificado como um mensageiro químico endógeno derivado do endotélio e responsável pela regulação do tônus vascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI 1980, PALMER et al 1987). Esse importante mediador é produzido por quase todas as células de mamíferos e possui um amplo espectro de atividades sinalizadoras nos processos fisiológicos e fisiopatológicos (BOGDAN, 2001). A produção de óxido nítrico é mediada constitutivamente pela óxido nítrico sintase constitutiva (nNOS ou eNOS) ou pelo aumento da expressão da óxido nítrico sintase (iNOS) induzível, enzima regulada por mediadores inflamatórios e envolvida na patogénia da resposta inflamatória (D'ACQUISTO et al, 1999; LI; POULOS, 2005). O NO é conhecido por controlar o tônus da musculatura lisa vascular, reduzir a ativação plaquetária, inibir a ativação e a adesão leucocitária, e por atuar como co-transmissor em sinapses não-adrenérgicas não-colinérgicas (NANC) (MONCADA et al, 1991, QUINN et al, 1995). Quando liberado do endotélio, o NO promove vasodilatação e pode se combinar com ânions superóxidos (O₂⁻) para formar peroxinitrito (ONOO⁻), que leva à oxidação lipídica e fragmentação do DNA, ocasionando morte celular (BOGDAN et al, 2001 a e b), incluindo leucócitos (TAYLOR et al 2003).

Nossos resultados demonstraram que a incubação da própolis P1, não alterou significativamente a expressão da enzima eNOS em células endoteliais vasculares, nem tampouco a atividade desta enzima, demonstrando que este sistema não parece estar envolvido na atividade antiinflamatória associada às alterações vasculares. Entretanto, em culturas celulares de macrófagos murinos, RAW 264.7, a própolis P1 foi capaz de reduzir de maneira significativa a produção de NO, de maneira dependente da dose, no sobrenadante de cultura, após a ativação com LPS. Esse efeito também foi bem reproduzido pela incubação das células de macrófagos murinos com Artepillin C. Esses resultados demonstram que P1 e o Artepillin C são capazes de reduzir a ativação macrofágica por estímulos inflamatórios como o LPS, reduzindo assim a sua capacidade de resposta celular e de produção de óxido nítrico. Esses resultados indicaram que o Artepillin C pode contribuir com uma boa parcela de efeito para a atividade inibitória do extrato P1 sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (RAW 264.7).

Além dos efeitos vasculares produzidos pelo óxido nítrico, o controle da responsividade vascular e da diferenciação de células de músculo liso vascular é, em grande parte, decorrente da via de ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). De fato, tem sido relatado que o sistema da MAPK e, em especial da família p38-MAPK, responde pela sinalização celular desencadeada pela ativação dos receptores AT1 para a angiotensina, potente agente vasoconstritor. A resistência vascular e o aumento da proliferação celular no leito vascular são atividades previstas para neurotransmissores endógenos que ativam o sistema da p38-MAPK, como a angiotensina II e a endotelina 1. A p38 também está diretamente envolvida na inicialização da resposta imunológica e na maturação do sistema imune, além de regular o processo de regeneração celular (KYRIAKIS; AVRUCH,

2001; GALLO; JOHNSON, 2002). Entre outros efeitos, a ativação do sistema da MAPK pode produzir aumento da expressão e ativação dos elementos de resposta antioxidantes e da cloranfenicol acetiltransferase (CAT) relacionadas ao sistema de detoxicação celular, como demonstrado para o chá verde (YU et al, 1997), aumentando a capacidade das células, incluindo as do músculo liso vascular, de eliminar as espécies reativas de oxigênio, em especial aqueles formados durante o processo de isquemia/reperfusão (BOGOYEVITCH et al, 1996). Uma grande quantidade de estímulos externos utilizam a via de sinalização da MAPK para a resposta celular (HAN et al, 1994; LEE et al, 1994), incluindo o processo de migração celular, proliferação, diferenciação e crescimento celular (NEW; HAN, 1998; BOKEMEYER et al, 19998; CASANOVAS et al, 2000; GUAN et al, 1998; GUAY et al, 1997).

A resposta vascular para estímulos mecânicos envolve processos inflamatórios e de proliferação de fibroblastos que resultam na formação da neointima e, portanto, na remodelação vascular. Está, também, bem estabelecido que as lesões mecânicas vasculares levam à produção de citocinas e moléculas pró-inflamatórias, que por sua vez, produzem ativação da p38-MAPK. Dados da literatura apontam que esta enzima é ativada na parede vascular após a lesão e promove a formação da neointima, e esse efeito pode estar diretamente relacionado à liberação de citocinas e fatores de crescimento (JACKSON et al, 1997). Recentemente, Jacob et al, (2005) demonstraram que a lesão de células do músculo liso vascular aumenta a fosforilação da p38-MAPK nos sítios da treonina e tirosina. Estes resultados sugerem que a fosforilação foi maior para o estímulo proliferativo, induzido pela lesão, que aquele produzido pelo estresse mecânico induzido pelo sangue circulante.

Um dos eventos iniciais na lesão da parede vascular é a apoptose, e a p38-MAPK assume papel relevante na sua indução (JACKSON, 1997). De fato, estudos recentes demonstram que a ativação da p38-MAPK induz apoptose em células monolaminares dos vasos e, com isso, reduziu a capacidade de adesão celular de linfócitos circulantes. Todavia, enquanto a fosforilação da p38-MAPK promove apoptose em células monolaminares vasculares e proliferação fiblástica em células da intima em cardiomiócitos, a ativação da p38-MAPK aumenta a sobrevivência dos cardiomiócitos e tem efeito cardioprotetor (ZECHNER et al, 1997). Mackay et al (1999) confirmaram esses resultados, demonstrando que a ativação da p38-MAPK protege os cardiomiócitos da apoptose contribuindo para o crescimento hipertrófico do músculo cardíaco. Já tem sido descrito que a própolis européia e o seu principal constituinte CAPE ativa o sistema da p38-MAPK em células tumorais induzindo a apoptose celular e em células de linfócitos promovendo a diferenciação celular e a secreção de citocinas como a IL-2 e IL-4 (LEE et al, 2003; ANSORGE et al, 2003).

Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que o tratamento com por com a própolis P1 produziu ativação direta da expressão da enzima p38-MAPK nas células musculares lisas vasculares, em cultura primária, podendo com isso, produzir um conseqüente aumento do número de células musculares lisas vasculares. Esse efeito está relacionado diretamente ao aumento da resistência vascular periférica e pode ser associado à inibição da capacidade de marginação e quimiotaxia das células de defesa (RINCON et al, 2000), como já descrito para outros polifenóis (YU et al, 1997; MENG et al, 2002; SUNDELL et al, 2003). Considerando que a p38 é um alvo importante utilizado pelas grandes indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novas drogas para tratar várias patologias como as doenças inflamatórias, incluindo artrite reumatóide e doença de Crohn,

doença de Alzheimer, entre outras (KUMAR et al, 2003). Estudos adicionais, utilizando a própolis P1 ou seus constituintes isolados, deveriam ser realizados para melhor avaliar sua ação nessa enzima.

Nos últimos anos, tem sido demonstrado claramente que existem múltiplos paralelos entre as vias de ativação do sistema das MAPKs com a regulação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B), que possui papel chave no desenvolvimento de inúmeras patologias, incluindo a inflamação, e assim se torna evidente a importância desses fatores como alvos moleculares de ação de novas drogas antiinflamatórias (KYRIAKIS; AVRUCH, 2001; NATOLI et al, 2005).

O NF- κ B pode ser multi-regulado por vários elementos endógenos e/ou exógenos e é um dos principais fatores responsáveis pela ativação da transcrição da enzima cicloxigenase durante o processo inflamatório (COX₂). Essa enzima controla a gênese de prostaglandinas que surge em resposta a um estímulo flogístico (SAKAI et al, 1997), como por exemplo, no edema de pata ou pleurisia induzidas por carragenina. As funções biológicas do NF- κ B são diversas, incluindo o desenvolvimento embrionário e a resposta ao estresse e inflamação. O NF κ B exerce papel chave no controle da expressão de múltiplos genes inflamatórios e imunes (FINCO; BALDWIN, 1995; NATOLI et al, 2005), como durante o choque tóxico, na resposta de fase aguda, no dano celular à radiação, na asma, na artrite reumática, na aterosclerose, no câncer e na imunodeficiência adquirida (AIDS). Assim, a esse fator de transcrição nuclear é atualmente considerado um importante alvo terapêutico para a descoberta de novas drogas para o tratamento de processos inflamatórios e imunes de múltiplas e diversas origens (BARNES; KARIN, 1997; NATOLI et al, 2005).

Muitos dos efeitos biológicos e bioquímicos observados para os inibidores do NF- κ B, até o momento relatados, são mediados através do bloqueio da via de sinalização que leva à ativação do NF κ B ou pelo comprometimento da capacidade de ligação do NF κ B no seu alvo no DNA, apresentando inúmeras interfaces para a ação terapêutica de novos fármacos (WU; KRAL, 2005; NATOLI et al, 2005). Alguns antioxidantes inibem o NF κ B pelo bloqueio da sinalização que leva a fosforilação do I κ B. Neste ponto, os antioxidantes, como alguns derivados do ácido caféico (CAPE), também encontrados em amostras de própolis da Europa, podem prevenir a oxidação de cisteínas sensíveis ao potencial redox em quinases ou fosfatases (SCHULZE-OSTHOFF et al, 1995, LI; KARIN, 1999), podendo assim justificar os efeitos antiinflamatórios e citotóxicos da própolis e de compostos fenólicos antioxidantes como o CAPE, galangina e ácido ferúlico que inibem a produção de citocinas e MIP-2 em células RAW 264.7 (GRUNBERGER, 1988; BORRELLI et al, 2002; SAKAI et al, 1997).

Em nossos experimentos demonstramos, pela primeira vez, que a incubação de própolis P1, bem como do Artepillin C, mas não dos compostos fenólicos estudados (G2, I e C), apresentou ação inibitória sobre a atividade do NF κ B expresso em células embrionárias de rim humano (HEK). Esses resultados em conjunto indicam que o Artepillin C contribui de maneira importante para a ação inibitória do extrato P1 sobre a atividade específica do NF κ B e, por conseguinte, para o efeito antiinflamatório do extrato de própolis P1.

Existem evidências crescentes demonstrando que inibidores de proteosomas e da calpaina, como o MG132 (utilizado como controle positivo em nosso experimento), lactacistina, e calpastatina são potentes inibidores da ativação do NF κ B e que eles agem através do bloqueio da degradação do I κ B

(BEAUPARLANT; HISCOTT, 1996; CHEN et al, 1997). Esse mecanismo parece em grande parte ser modulado positivamente pela presença de estímulos oxidativos, como os produzidos por radicais livres.

É bem documentado na literatura que a própolis brasileira ou seus constituintes fenólicos (Artepillin C[®] e derivados) apresentam atividades seqüestrantes de radicais livres e antioxidantes (BASNET et al, 1996; HAYASHI et al, 1999; UTO et al, 2002 a e b) e possuem biodisponibilidade para apresentar esse efeito *in vivo* (SHIMIZU, et al, 2004).

De fato, o grande problema para o desenvolvimento de fitomedicamentos ou de medicamentos à base de produtos naturais, como por exemplo, a própolis, é a determinação de substâncias marcadoras que sejam biodisponíveis e que representem, pelo menos em parte, a atividade biológica observada para o extrato (biomarcador). Essas substâncias servem para a definição dos critérios posológicos temporais, determinação de doses efetivas e para a validação química de controle de qualidade dos medicamentos de origem natural. Bhattaram et al (2002) apresentaram revisão de inúmeros biomarcadores e suas plantas de origem, além de referir os métodos para a identificação da atividade relacionada aos fitoterápicos.

Os nossos resultados descrevem, pela primeira vez, o Artepillin C, compostos majoritário na própolis brasileira, como uma substância fenólico bioativo antiinflamatório e biodisponível por via oral. De fato, esse efeito foi sugerido recentemente por Shimizu et al (2004) onde os efeitos antioxidantes do Artepillin C foram encontrados a partir da administração oral de própolis brasileira. No estudo de biodisponibilidade, 24% do Artepillin atravessou a membrana das células intestinais e 5% desse total foram absorvidos pelos hepatócitos na forma livre. Essa biodisponibilidade foi, em parte, decorrente da presença de outros compostos

fenólicos presentes na amostra de própolis estudada, tais como ácido p-cumárico, naringenina e crisina (SHIMIZU et al, 2004).

Tem sido relatado que a presença de prenilas livres na molécula dos compostos fenólicos é um importante fator para facilitar o aumento da biodisponibilidade e a efetividade antioxidante destas moléculas, em especial, para aquelas relacionadas ao dano oxidativo por peroxidação lipídica da membrana celular e nuclear (KASAI et al, 2002). Essa afirmação foi confirmada anteriormente nos experimentos de Kimoto (2000, 2001), onde a administração oral de própolis para camundongos submetidos a um estímulo carcinogênico com nitriloacetato férrico registrou um pico de absorção para o Artepillin C em 12 h, quando avaliado no fígado, rins e pulmão. Ambos, própolis e, em menor extensão, o Artepillin C, foram capazes de inibir as alterações morfológicas celulares e inflamatórias induzidas pelo agente carcinogênico oxidativo no fígado, rins e pulmão (KIMOTO et al, 2000, 2001).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento dos camundongos com a própolis P1 resultou em concentrações plasmáticas de Artepillin C, com pico máximo em 2 h que não diferiu estatisticamente dos valores obtidos para a 1 h ou 30 min e representou cerca de 25% do Artepillin C encontrado no extrato P1. De modo similar a administração de Artepillin C, pela via oral, demonstrou que cerca de 17% de constituinte pode ser detectado na circulação sistêmica após 1 h.

6 SUMÁRIO

Embora, de maneira geral, a própolis e seus principais constituintes vêm sendo bastante estudados em todo o mundo, a própolis brasileira tem recebido muito menos atenção. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a administração sistêmica, intraperitoneal ou oral, da própolis P1 ou do seu principal constituinte, o Artepillin C, produziu marcada inibição da resposta edematogênica e inflamatória, nos modelos animais de inflamação. Esses efeitos foram acompanhados de redução da produção e liberação de prostaglandina E_2 , da inibição da produção de óxido nítrico em resposta à estimulação de macrófagos (RAW 24.7) em cultura celular, sem no entanto, alterar a expressão ou atividade da eNOS.

Além disso, a incubação da própolis P1, em cultura primária de células de músculo liso vascular, aumentou a atividade da enzima p38-MAPK, alvo para o desenvolvimento de novas drogas antiinflamatórias, e mais importante, esse efeito foi associado com a inibição da atividade do $NF\kappa B$ em células HEK 293.

Foi também demonstrado, no presente estudo, que o Artepillin C, componente majoritário presente na própolis P1, é o responsável por grande parte das ações antiinflamatórias observadas para a fração P1 da própolis brasileira. Um aspecto interessante e demonstrado, pela primeira vez, foi a realização de estudo de

farmacocinética pelo uso de duas distintas técnicas, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa, tendo como marcador ativo o Artepillin C, avaliado na corrente sanguínea após a administração oral de própolis P1. Esses resultados demonstraram que nas mesmas doses e via de administração em que a própolis P1 produz ação antiinflamatória é possível detectar no plasma níveis elevados do seu principal princípio ativo, o Artepillin C. Certamente, esses novos resultados irão contribuir, em muito, para a formulação de um produto padronizado a partir da própolis P1, tendo como marcador ativo o Artepillin C.

Analisados em conjunto, os nossos resultados confirmam e também estendem, substancialmente, os estudos existentes na literatura sobre as propriedades antiinflamatórias da própolis brasileira e contribuem, consideravelmente para o estabelecimento do marcador ativo, bem como para os avanços e para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nessas ações, em especial, sobre a enzima p38-MAPK e sobre o fator nuclear κ B. Merecem também destaque os esforços realizados para avaliar a farmacocinética do princípio ativo majoritário presente na própolis P1, o Artepillin C.

7 CONCLUSÃO

Própolis e Artepillin C possuem ações antiinflamatórias pronunciadas quando testados por via sistêmica. Os efeitos antiinflamatórios evidenciados para o extrato de própolis P1 são reproduzidos pelo Artepillin C. Essas ações antiinflamatórias estão associadas com a inibição da produção de PGE2, inibição da produção de NO, por inibição do NFκB, e em menor escala pela via da p38-MAPK. Além disso, nossos resultados demonstram pela primeira vez que o Artepillin C, composto majoritário na própolis P1, constitui-se em um marcador químico, com boa biodisponibilidade, podendo servir como indicador para a padronização do extrato de própolis P1. A padronização química do extrato de própolis P1 é requisito necessário para a realização de ensaios clínicos para a validação da eficácia antiinflamatória.

REFERÊNCIAS

ABD AL HADY, F. K.; HEGAZI, A. G. Egyptian propolis: 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of Delta propolis. **Z. Naturforsch. C.** n. 57, p. 386-394, 2002.

AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Biosic. Biotech. Biochem.** n. 58, p. 945-946, 1994.

AGOSTINHO, R. H. **Própolis**: Desconhecido muito conhecido na antiguidade. <http://www.saude-natural.pt/jornal/que.htm>. 13 jun., 1998.

AHUMADA, C. et al. The effects of a triterpene fraction isolated from *Crataegus monogyna* Jacq. on different acute inflammation models in rats and mice. Leucocyte migration and phospholipase A2 inhibition. **J. Pharm. Pharmacol.** n. 49, p. 329-331, 1997.

AKAO, Y. et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biol. Pharm. Bull.** n. 26, p. 1057-1059, 2003.

AKIHISA, T. et al. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry.** n. 43, p. 1255-1260, 1996.

ALFARO, V. Role of histamine and platelet-activating factor in allergic rhinitis. **J. Physiol. Biochem.** n. 60, p. 101-111, 2004.

AMOROS, M. et al. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, n. 3, p. 231-240, 1992a.

AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes Simplex virus typel in cell culture. Comparasion with the antiviral activity of propolis. **J. Prod. Nat.** n. 12, p. 1732-1740, 1992b.

ANSORGE, S.; REINHOLD, D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. **Z Naturforsch [C]**. n. 58, p. 580-589, 2003.

ARAI, S. et al. Antitumor agent. **United State Patent n°US5710179**, 1998.

ASO, K. et al. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biol. Pharm. Bull.** n. 27, p. 727-730, 2004.

JÚNIOR BALDWIN, A. S. The NF- kB, I kB proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.** n. 14, p. 649–683, 1996.

BANKOVA, V. et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao Paulo state. **Z Naturforsch [C]**. n. 54, p. 401-405, 1999.

BANKOVA, V. et al. Determination of phenolics from propolis by gas chromatography. **J. Chromatogr.** n. 607, p. 150-153, 1992b.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition and anti-bacterial activity of Brazilian propolis. **Z. Naturfosrsch.** n. 50, p. 167-172, 1995.

_____. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia. Phenolic compounds and plant origin. **Apidologie.** n. 23, p. 79-85, 1992a.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z-Naturforsch.** n. 51, p. 277-280, 1996.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Z Naturforsch [C]**. n. 57, p. 530-533, 2002.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N. L. A study on flavanoids of propolis. **J. Prod. Nat.** n. 46, p. 471-474, 1983.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytother. Res.** n. 15, p. 561-571, 2001.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor κ B - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **New Engl. J. Med.** n. 366, p. 1066–1071, 1997.

BASNET, P. et al. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. **Biol. Pharm. Bull.** n. 19, p. 1479-1484, 1996a.

_____. Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. **Biol. Pharm. Bull.** n. 19, p. 655-657, 1996b.

BEAUPARLANT, P.; HISCOTT, J. Biological and biochemical inhibitors of the NF- κ B/Rel proteins and cytokine synthesis. **Cytokine Growth Factor Rev.** n. 7, p. 175–190, 1996.

BEHI, M. E. et al. New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Immunol. Lett.** n. 96, p. 11-26, 2005.

BHATTARAM, V. A. et al. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine** n. 9, p. 1-33, 2002.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat. Immunol.** n. 2, p. 907-916, 2001a.

_____. Nitric oxide and the regulation of gene expression. **Trends Cell. Biol.** n. 11, p. 66-75, 2001b.

BOGOYEVITCH, M. A. et al. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. **Circ Res.** n. 79, p. 162-173, 1996.

BOKEMEYER, D.; LINDEMANN, M.; KRAMER, H. J. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells. **Hypertension** n. 32 (1998), p. 661–667, 1998.

BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**. n. 73 Suppl 1, p. S53-S63, 2002.

BOTTING, R.; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**. n. 72, p. 85-87, 2005.

BOTUSHANOV, P. I.; GRIGOROV, G. I.; ALEKSANDROV, G. A. A clinical study of a silicate toothpaste with extract from propolis. **Folia Med (Plovidiv)**. n. 43, p. 28-30, 2001.

BOYANOVA, L. et al. Inhibition of Helicobacter pylori growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. **J. Med. Microbiol.** n. 52(Pt 5), p. 417-419, 2003.

BREYER, M. D.; BREYER, R. M. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney. **Annu. Rev. Physiol.** n. 63, p. 579-605, 2001.

BREYER, U. E. **Abelhas e Saúde**. 6. ed. Porto União: Uniporto Gráfica e Editora, p. 1-5. 1991

BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J. M. T.; FRANKLIN I. Antibiotic activity of natural products: Propolis. **Microbios**, n. 62, p. 19-22, 1990.

BUCCI, M. et al. Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 2005.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food Chem. Toxicol.** n.36, p. 347-363, 1998.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Med.** n. 69, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytother. Res.** n. 14, p. 401-418, 2000.

CALIXTO, J. B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.** n. 70, p. 93-103, 2004.

CAMPBELL, J. D. et al. Systemic chemokine and chemokine receptor responses are divergent in allergic versus non-allergic humans. **International Immunology**. n. 11, p. 1255-1262, 2002.

CAMPOS, R. O. de et al. Anti-hyperalgesic effect of ethanolic extract of propolis in mice and rats. **J. Pharm. Pharmacol.** n. 50, p. 1187-1193, 1998.

CARDILE, V. et al. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. **Life Sci.** n. 73(8), p. 1027-1035, 2003.

CARVALHO, J. C. et al. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **J. Ethnopharmacol.** n. 64, p. 127-133, 1999.

CASANOVAS, O. et al. Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. **J Biol Chem** n. 275, p. 35091–35097, 2000.

CELLI, N. et al. Development and validation of liquid chromatographic-tandem mass spectrometric model determination of caffeic acid phenethyl ester in rat plasma and urine. **J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life Sci.** n. 15, p. 129-136, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs cloning, structure and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** n. 99, p. 13926–13931, 2002.

CHEN, C. Y. et al. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effect and apoptosis induction melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.** n 1, p 175-185, 2004.

CHEN, F. et al. New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. **Clin. Chem.** n. 45, p. 7-11, 1999.

CHEN, F. et al. Calpain contributes to silica-induced I κ B α degradation and nuclear factor- κ B activation. **Arch. Biochem. Biophys.** n. 342, p. 383–388, 1997.

CHENG, X. et al. TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. **J. Clin. Immunol.** n. 25, p. 246-253, 2005.

CICALA, C. et al. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. **Life Sci.** v. 23, n. 73(1), p. 73-80, 2003.

CLERICI, M. T. P. S. Uso da própolis na dermatologia e produção de cosméticos. **Revista da Universidade de Franca**, São Paulo: Associação Cultural e Educacional de Franca, p. 24, ago., 1999.

COCHRANE, C. G. Mediating systems in inflammatory disease. **J. Invest. Dermatol.** n. 71, p. 40-48, 1978.

COHEN, H. A. et al. Effectiveness of an herbal preparation containing achinacea, propolis, and vitamin C in the respiratory tract infections in children: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.** n. 158, p. 217-221, 2004.

COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol. Rev.** n. 46, p. 205-229, 1994.

CORTANI, G. Estrazione della frazione oleoresinosa de utilizzazione de tqale resina nella preparazione de prodotte cosmetic. **Rev. Ital. Sist. Grasse**, n. 68, p. 99-100, 1991.

COS, P. et al. In vitro antioxidant profile of phenolic acid derivatives. **Free Radic. Res.** n. 36, p. 711-716, 2002.

CZERMAK, B. J.; FRIEDL, H. P.; WARD, P. A. Complement, cytokines, and adhesion molecule expression in inflammatory reactions. **Proc. Assoc. Am. Physicians.** n. 110, p. 306-312, 1998.

D'ACQUISTO, F. et al. Nuclear factor-kappaB activation mediates inducible nitric oxide synthase expression in carrageenin-induced rat pleurisy. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** n. 360, p. 670-675, 1999.

CUNHA, F. M. da et al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. **Free Radic. Res.** n. 38, p. 1241-1253, 2004.

DA SILVA CUNHA, I. B. et al. Antitripanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. **Chem. Pharm. Bull (Tokyo)**. n. 52, p. 602-604, 2004.

DEBIAGGI, M., TATEO, F., PAGANI, L., LUINI, M., ROMERO, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiologia**. n 13, p 207-213, 1990.

DEBUYSE, E. **La própolis**. França: Universidade de Nantes, 1983.

DIRSCH, V. M.; KEISS, H. P.; VOLLMAR, A. M. Garlic metabolites fail to inhibit the activation of the transcription factor NF-kappaB and subsequent expression of the adhesion molecule E-selectin in human endothelial cells. **Eur. J. Nutr.** v. 43, n. 1, p. 55-59. 2004.

DIRSCH, V. M. et al. The triterpenoid quinonemethide pristimerin inhibits induction of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages. **Eur. J. Pharmacol.** n. 336, p. 211-217, 1997.

DOBROWOSKI, J. W. et al. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **J. Ethnopharmacol.** n. 35, p. 77-82, 1991.

EL-KHATIB, A. S. et al. Profilactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxic. **Z. Naturforsch. [C]**. n. 57, p. 379-385, 2002.

ENDO, T. et al. Comparison of the regulations by Th2-type cytokines of the arachidonic-acid metabolic pathway in human alveolar macrophages and monocytes. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** n. 19, p. 300-307, 1998.

FENG, L. et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. **Arch. Biochem. Biophys.** n. 307, p. 361-368, 1993.

FIALA, M. et al. Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. **Eur. J. Clin. Invest.** n. 32, p. 360-371, 2002.

FINCO, T. S., BALDWIN, A. S. Mechanistic aspects of NF κ B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. **Immunity**. n. 3, p. 263-272, 1995.

FLEMING, P. R. et al. A statistical analysis of amino acid sequence in protein chains. **Int. J. Biomed. Comput.** n. 3, p. 91-100, 1972.

FRODE-SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B. Synergistic antiinflammatory effect of NF-kappaB inhibitors and steroidal or non steroidal antiinflammatory drugs in the pleural inflammation induced by carrageenan in mice. **Inflamm. Res.** n. 49, p. 330-337, 2000.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** n. 288, p. 373-376, 1980.

GALLO, K. A.; JOHNSON, G. L. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol.** n. 3, p. 663-672, 2002.

GERONDAKIS, S. et al. The regulation and roles of Rel/NF-kappa B transcription factors during lymphocyte activation. **Curr. Opin. Immunol.** n. 10, p. 353-359, 1998.

GHISALBERTI, E. L. Propolis, A Review. **Bee world.** n. 60, p. 59-84, 1979.

GHOSH, S.; BALTIMORE D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappaB. **Nature.** n. 344, p. 678-682, 1990.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and Rel proteins Evolutionary conserved mediators of immune responses. **Ann. Rev. Immunol.** n. 16, p. 225-230, 1998.

GOETZ P. Monographies medicalistes de phitotherapie própolis. **Rev. Phytoth. Prat.**, p. 29-30, 1990

GOJMERAC, W. L. Bees beekeeping and pollination. **AVI Publ. Co., Inc.:** Connecticut, p. 116, 1980.

GONZÁLEZ, S. J. Uso da própolis em Clínica Médica. **Revista da Universidade de Franca**, São Paulo: Associação Cultural e Educacional de Franca, p. 15 ago., 1999.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J. Royal Soc. Med.** n. 24, p. 223-224, 1990.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World.** n. 71, p. 107-118, 1990.

GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N., LEFER, D. J. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. **Free Rad. Biol. Med.** n. 25, p. 404-403, 1998.

GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenetil ester isolated from propolis. **Experientia.** n. 44, p. 230-232, 1988.

GRUNBERGER, D.; FRENKEL, K. Inhibition of caract formation, diseases resulting from oxidative stress, and HIV replication by caffeic acid esters. **United State Patent n°US5591773**, 1997.

GUAN, Z. et al. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1→SEK1/MKK4→p38 mitogen-activated protein kinase pathway. **J. Biol. Chem.** n. 273, p. 12901–12908, 1998.

GUAY, J. et al. Regulation of actin filaments dynamics by p38 MAP kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. **J. Cell Sci.** n. 110, p. 357–368, 1997.

HAN, J. et al. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. **Science** n. 265, p. 808–811, 1994.

HAN, S. et al. Activation of murine macrophage cell line RAW 264.7 by Korean propolis. **Arch Pharm Res.** n. 25, p. 895-902, 2002.

HATA, A. N.; BREYER, R. M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacol. Ther.** n. 103, p. 147-166, 2004.

HAUSEN, B. M. et al. Propolis allergy (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. **Contact-Dermatitis.** v. 26, p. 34-44, 1992.

HAYASHI, K. Et al. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. **Chem. Pharm. Bull.**, n. 47, p. 1521-1524, 1999.

HECKER, M.; CATTARUZZA, M.; WAGNER, A. H. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. **Gen. Pharmacol.**, n. 32, p. 9-16, 1999.

HIGASHI, K. O. et al. Effect of propolis extract on *Trypanosoma cruzi* infected cell cultures and experimental animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** n. 1, p. 236, 1991.

HOLDERNA E.; KEDZIA, B. Investigations upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on *Candida albicans*. **Herba Pol.** n. 32, p. 145-151, 1987.

HU, F. et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol.** May 14; 2005.

HUANG, M. T. et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. **Carcinogenesis.** n. 17, p. 761-765, 1996.

HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Isr Med Assoc J.** n. 4(11 Suppl), p. 923-927, 2002.

ICHIKAWA, H. et al. Free radical scavenging activity of propolis. **Redox Rep.** n. 7, p. 347-350, 2002.

IKEGAKI, M. et al. Determinação das características físico-químicas e algumas propriedades biológicas de própolis coletadas na região Sul do Brasil. **Revista da Universidade de Franca**, São Paulo: Associação Cultural e Educacional de Franca, p. 44, ago., 1999.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Res.** n. 25, p. 347-351, 1991.

ILHAN, A. et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. **Free Radic. Biol. Med.** n. 37, p. 386-394, 2004.

IOIRICH, N. P. **As abelhas farmacêuticas com asas.** 2. ed. União da Vitória: Editora MIR, p. 183, 1981.

IVANOVSKA, N. D. et al. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water-soluble derivative on complement activity in vivo. **J. Ethnopharmacol.** n. 47, p. 145-147, 1995.

JACKSON, J. R. et al. Pharmacological effects of SB220025, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** n. 284, p. 687–692, 1997.

JACOB, T. et al. Activation of p38MAPK signaling cascade in a VSMC injury model: role of p38MAPK inhibitors in limiting VSMC proliferation. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.** n. 29, p. 470-478, 2005.

JAISWAL, A. K. et al. Caffeic acid phenethyl ester stimulates human antioxidant response element-mediated expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene. **Cancer Res.** n. 57, p. 440-446, 1997.

KAIN, G.; STEINBERG, D.; GEDALIA, Y. *In vivo* and *in vitro* antibacterial activity of propolis and honey. **Internacional Conference on - Bee Products: Proprieties, applications e apitherapy**, Israel: The Israel Honey Production and Marketing Board and The Israel Beekeepers Association, p. 71, 1996.

KARTAL, M. et al. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **J. Ethnopharmacol.** n. 86, p. 69-73, 2003.

KASAI H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. **Free Radic. Biol. Med.** n. 33, p. 450-456, 2002.

KENNEDY, C. R. et al. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. **Nat. Med.** n. 5, p. 217–220, 1999.

KHAYYAL, M. T.; EL GHAZALY, M. A.; EL KHATIB, A. S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Exp. Clin. Res.** n. 19, p. 197-203, 1993.

KHAYYAL, M. T. et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundam. Clin. Pharmacol.** n. 17, p. 93-102, 2003.

KIEMER, A. K.; VOLLMAR, A. M. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. **Ann. Rheum. Dis.** n. 60 Suppl. 3, p. 68-70, 2001.

KIMOTO, T. et al. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Res.** n. 21, p. 221-228, 2001a.

KIMOTO, T. et al. Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the artemillin C extracted from Brazilian propolis. **Gan-To-Kagaku-Ryoho**. n. 23, p. 1855-1859, 1996.

KIMOTO, T.; CHAEN, H.; KURIMOTO, M. Apoptosis-controlling agent. **United State Patent n°US5830914**. 1998.

KIMOTO, T. et al. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. **Pathol. Int.** n. 50, p. 679-689, 2000.

KIMOTO, T. et al. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. **Virchows Arch.** n. 438, p. 259-270, 2001b.

KLUGER, M. S. Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment. **Adv Dermatol.** n. 20, p. 163-201, 2004.

KOKSEL, O. et al. A. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. **Pulm. Pharmacol. Ther.** Jan. 2005

KROL, W. et al. Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. **Biochem. Int.** n. 21, p. 593-597, 1990.

KROL, W. et al. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotic on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneim. Forsch. Drug. Res.** n. 43, p. 607-609, 1993.

KUBES, P. The complexities of leukocyte recruitment. **Semin. Immunol.** n 14, p 65-72, 2002.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes **Prost & Other Lipid Mediators**. n. 68-69 p.3-5, 2002.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol.** n 64, p 235-240, 1999.

KUMAR, S.; BOEHM, J.; LEE, J.C. P38 MAP kinases: key signaling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nature reviews (Drug discovery)* v. 2 p. 717-726, 2003.

KUMAZAWA, S. et al. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. **J. Agric. Food Chem.** n. 14, p. 4777-4782, 2002.

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**. n. 51, p. 740-742, 2003.

KUO, H. C. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. **Cancer Lett.** Maio 7; 2005 (in print).

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiol Rev.** n. 81, p. 807-869. 2001.

LEE, J. C. et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. **Nature** n. 372, p. 739-746, 1994.

LEE, Y. J. et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochem Pharmacol.** n. 66, p. 2281-2289, 2003.

LEITAO, D. P. et al. Comparative Evaluation of in-Vitro Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* Extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. **Biol. Pharm. Bull.** n. 27, p. 1834-1839, 2004.

LEJEUNE, B.; PURRAT, A.; DEHMOUCHE, J. Propolis utilization en dermocosmétique. **Prof. Cosm.** p. 73-77, agos./set. 1988.

LI, H. ; POULOS, T. L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **J. Inorg. Biochem.** n. 99, p. 293-305, 2005.

LI, N.; KARIN, M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? **FASEB J.** n. 3, p. 1137-1143, 1999.

LIN, S. C. et al. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. **Am. J. Chin. Med.** n. 25, p. 325-332, 1997.

LIRA, C. O uso de própolis na cirurgia plástica (sobre os resultados obtidos pelo Dr, Luciano Mujalli). **Homeopatia e Vida**, Rio de Janeiro. P. 2, jan. 1994.

LIU, C. F. et al. Cytoprotection by propolis ethanol extract of acute absolute ethanol-induced gastric mucosal lesions. **Am. J. Chin. Med.** n 30, p 245-254, 2002.

_____. Antioxidative natural product protect against econazole-induced liver injuries. **Toxicology.** n. 196, p. 87-93, 2004.

MACEDO, S. B. Uso da própolis em Clínica Odontológica, **Revista da Universidade de Franca**, São Paulo: Associação Cultural e Educacional de Franca, p. 15 ago., 1999.

MACKAY, K.; MOCHLY-ROSEN, D. An inhibitor of p38 mitogen activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. **J. Biol. Chem.** n. 274, p. 6272–6279, 1999.

MAJIENE, D. et al. Investigation of chemical composition of propolis extract. **Medicina (Kaunas).** n. 40, p. 771-774, 2004.

MARCUCCI, M. C. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Química Nova.** n. 19, p. 529-336, 1996a.

_____. Processo de identificação de tipagens da própolis Brasileira. **Patente no INPI: PI0006272**, 2000.

_____. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie.** n. 26, p. 83-99, 1995.

_____. Utilização da própolis na indústria cosmética. **Aerossol e Cosméticos.** n. 89, p. 34-36, 1994.

MARCUCCI, M. C.; CAMARGO, F. A.; LOPES, C. M. A. Identification of amino acids in brazilian propolis, **Z. Naturforsch.** n. 51c, p. 11-14, 1996b.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol.** n 74, p 105-112, 2001.

MARKONIUS, M. Benzopyran phenol derivatives for use as antibacterial agents. **United State Patent n°US5449794**, 1995.

_____. Benzopyran phenol derivatives for use as antibacterial, antiviral or immunostimulating agents. **United State Patent n°US5861430**, 1999.

MARQUES, N. A. **Apicultura em marcha**. Tubarão: Dehon LTDA, p. 231-235, 1989.

MASTELLOS, D. et al. Complement: structure, functions, evolution, and viral molecular mimicry. **Immunol. Res.** n. 27, p. 367-386, 2003.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Z. Naturforsch.** n. 50c, p. 93-97, 1994.

_____. Isolation and characterization of the tumoricidal substances from Brazilian propolis. **Honeybee Sci.** n. 13, p. 49-54, 1992.

MATSUNO, T. et al. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Res.** n. 17, p. 3565-3568, 1997.

MAY, M. J; GHOSH, S. Signal transduction through NF-kappa B. **Immunol Today.** n. 19, p. 80-88, 1998.

McDONALD, T. V. et al. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittelforschung.** n. 49, p. 705-707, 1999.

MENEZES, H.; ALVAREZ, J. M.; ALMEIDA, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittelforschung.** n. 49, p. 705-707, 1999.

MENG, C. Q. et al. Novel phenolic antioxidants as multifunctional inhibitors of inducible VCAM-1 expression for use in atherosclerosis. **Bioorg. Méd. Chem. Lett.** n. 12, p. 2545-2548, 2002.

MERINO, N. et al. Histopathological evaluation on the effect of red propolis on liver damage induced by CCl4 in rats. **Arch. Med. Res.** n. 27, p. 285-289, 1996.

METZNER, J. et al. Zur antimikrobiellen werksankeet mit propolis und popolisinhaltsstoffen. **Pharmazie**. n. 34, p. 97-102, 1979.

METZNER, J. et al. Bioautographische erfassung der antimikrobiell wirksamen inhaltssotoffe von propolis. **Pharmazie**. n. 30, p. 799-800, 1975.

MIDORIKAWA, K. et al. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochem. Anal.** n. 12, p. 366-373, 2001.

MILLET-CLERC, L. et al. Preliminary study of the antifungal properteies of propolis compared with some commercial products. **Plant. Med. Phytoth.** n. 21, p. 3-7, 1987.

MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**. n. 55, p. 441-449, 1996.

MISHIMA, S. et al. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. **J. Ethnopharmacol.** n. 99, p. 5-11, 2005.

MIYATAKA, H. et al. Evaluation of própolis I. Evalution of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and phisico chemical methodus. **Biol. Pharm. Bull.** n. 20, p. 496-501, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** n. 43, p. 109-142, 1991.

MONTPIED, P. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Brain Res. Mol. Brain Res.** n. 115(2), p. 111-120, 2003.

MOORE, A. R. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. **Methods Mol. Biol.** n. 225, p. 123-128, 2003.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol. Biol.** n. 225, p. 115-121, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. n. 65, p. 55-63, 1983.

MOSS, R. B. et al. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. **Expert Opin. Biol. Ther.** n. 4, p. 1887-1896, 2004.

MUJALLI, L. Uso da própolis na cirurgia plástica, **Revista da Universidade de Franca**, São Paulo: Associação Cultural e Educacional de Franca, p. 15, ago., 1999.

MURAKAMI, M.; KUDO, I Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s. **Advances In Immunology.** n. 77, p. 163-194, 2001.

_____. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. **Progress in Lipid Research** n. 43, p. 3-35, 2004.

MURATA, K. et al. Antihyperglycemic effects of propolis mixed with mulberry leaf extract on patients with type 2 diabetes. **Altern. Ther. Health Med.** n. 10, p. 78-79, 2004.

NAGAOKA, T. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biol. Pharm. Bull.** n. 26, p. 487-491, 2003.

NAKANISHI, I. et al. Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Org. Biomol. Chem.** n. 1, p. 1452-1454, 2003.

NATARAJAN, K. et al. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** n. 93, p. 9090-9095, 1996.

NATOLI, G. et al. Interactions of NF-kappaB with chromatin: the art of being at the right place at the right time. **Nat. Immunol.** n. 6, p. 439-445, 2005.

NEW, L.; HAN, J. The p38 MAP kinase pathway and its biological function, **Trends Cardiovasc. Med.** n. 11, p. 8220-8229, 1998.

NGUYEN, M. et al. Receptors and signaling mechanisms required for prostaglandin E₂-mediated regulation of mast cell degranulation and IL-6 production. **J. Immunol.** n. 169, p. 4586-4593, 2002.

NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T. R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **J. Leukoc. Biol.** n. 54, p. 171-178, 1993.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** n. 327, p. 524-526, 1987.

PAULINO, N. et al. Mechanisms involved in the relaxant action of the ethanolic extract of propolis in the guinea-pig trachea in-vitro. **J. Pharm. Pharmacol.** n. 54, p. 845-852, 2002.

OCANÃ, M. et al. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur. J. Pharmacol.** n. 500, p. 203-219, 2004.

O'CONNOR, T. M. et al. The role of substance P in inflammatory disease. **Cell Physiol.** n. 201, p. 167-180, 2004.

OHISHI, S. Evaluation of time course and inter-relationship of inflammatory mediators in experimental inflammatory reaction. **Yakugaku Zasshi.** n. 120, p. 455-462, 2000.

ORBAN, Z. et al. Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor kappa B and suppresses acute inflammation. **Neuroimmunomodulation.** n. 7, p. 99-105, 2000.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **J. Ethnopharmacol.** n. 84, p. 265-273, 2003.

ORSOLIC, N. et al. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J. Ethnopharmacol.** n. 94, p. 307-315, 2004.

OZEAN, M. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. **J. Med. Food.** n. 7, p. 114-116, 2004.

OZTÜRK, F. et al. Effect of propolis on endotoxin-induced uveitis in rabbits. **Jpn. J. Ophthalmol.** jul., v. 43, p. 285-289, 1999.

PAINTZ, M.; METZNER, J. Zur iokalanasthetische wirkung von propolis und einigen inhaltsstoffen. **Pharmazie.** n. 34, p. 839-841, 1979.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. n. 327, p. 524-526, 1987.

PAMPLONA, B. Própolis: Composição e atividade terapêutica. **Revista Racine**, São Paulo, n. 37, p. 49-53, 1997.

PANG, L.; HOULT, J. R. Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E₂ and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. **Biochem. Pharmacol.** n. 53, p. 493-500, 1997.

PARK, J. S.; WOO, K. S. The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea. **Anais**. In: Internacional Conference on - Bee Products: Proprieties, applications and apitherapy, Israel, p. 75, 1996.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem.** n. 50, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem.** n. 52, p. 1100-1103, 2004.

PAULINO, N. et al. The antioceptive actions of propolis. **Internacional Conference on - Bee Products: Proprieties, applications e apitherapy**, Israel: The Israel Honey Production and Marketing Board and The Israel Beekeepers' Association, p. 61, 1996b.

PAULINO, N. et al. The mechanisms underlying the relaxant effect of methyl and ethyl gallates isolated in the guinea pig trachea "in vitro". The contribution of potassium channels. **Naunym Schhimeberg's Arch. Pharmacol.** n. 360, p. 331-336, 1999b.

PAULINO, N. et al. The relaxant effect of propolis in guinea pig isolated trachea. **Internacional Conference on - Bee Products: Proprieties, applications e apitherapy**, Israel : The Israel Honey Production and Marketing Board and The Israel Beekeepers' Association, p. 60, 1996c.

PAULINO, N. et al. Anxiolytic action of propolis in rats on the elevated plu-maze. **Internacional Conference on - Bee Products: Proprieties, applications e**

apitherapy, Israel: The Israel Honey Production and Marketing Board and The Israel Beekeepers' Association, p. 59, 1996a.

PAULINO, N. et al. The relaxant effect of propolis constituents in the guinea pig isolated trachea. In **8th International Symposium on Apitherapy, Portorose – Slovenia**. 1998.

PAULINO, N. et al. Anti-oedematogenic effect of a standardized ethanol extract of Brazilian propolis in mice. **Honeybee Sci.** n. 23, p. 23-26, 2002.

PAULINO, N. et al. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. **J. Pharmacol. Sci.** n. 93, p. 307-313, 2003.

PAUNESCU, C. Treatment of Acne. **United States Patent, US005399349A**, 1992.

PINHEIRO, R. M.; CALIXTO, J. B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflamm. Res.** n. 51, p. 603-610, 2002.

POPESCU, H. et al. Antiherpes ointment. **Romene Patent nº 86.003**, 1985.

POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochem. Anal.** n. 15, p. 235-240, 2004.

QUINN, A. C.; PETROS, A. J.; VALLANCE, P. Nitric oxide: an endogenous gas. **Br. J. Anaesth.** n. 74, p. 443-451, 1995.

RAHMAN, I.; MARWICK, J.; KIRKHAM, P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. **Biochem. Pharmacol.** n. 68, p. 1255-1267, 2004.

RANKIN, J. A. et al. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** n. 93, p. 7821-7825, 1996.

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clin. Issues.** n. 15, p. 3-17, 2004.

REYNAERT, N. L. et al. Nitric oxide and redox signaling in allergic airway inflammation. **Antioxid. Redox Signal.** n. 7, p. 129-143, 2005.

REZZANI, R. et al. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester against cyclosporine A-induced cardiotoxicity in rats. **Toxicology.** Junho 17, 2005 (in press).

RINCON, M.; FLAVELL, R. A.; DAVIS, R. A. The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. **Free Radic. Biol. Med.** n. 28, p. 1328-1337, 2000.

ROCHA E SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. 1978. **Agents Actions.** n. 43, p. 86-90, 1994.

ROCH-ARVEILLER, M.; GIROUD, J. P. Biological and pharmacological effects of carrageenan. **Pathol. Biol. (Paris).** n. 27, p. 615-626, 1979.

ROSSI, A. et al. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. **Phytomedicine.** n. 9, p. 530-535, 2002.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia.** n. 73, p. S21-9, 2002.

SAKAI, H. et al. Thromboxane A₂, released by the anti-tumour drug irinotecan, is a novel stimulator of Cl⁻ secretion in isolated rat colon. **J. Physiol.** n. 505, p. 133-144, 1997.

SAKAMOTO, S. et al. Effects of propolis on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced skin tumours and on lifespan of tumour-bearing mice. **J. Traditional Med.** n. 11, p. 114-117, 1994.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br. J. Pharmacol.** n. 118, p. 811-819, 1996.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur. J. Pharmacol.** n. 331, p. 43-52, 1997.

SANGVAI, S. et al. Can an herbal preparation of echinacea, propolis, and vitamin C reduce respiratory illnesses in children? **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.** n. 158, p. 222-224, 2004.

SANTOS, F. A. et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytother. Res.** n. 17, p. 285-289, 2003.

SA-NUNES, A. ; FACCIOLI, L. H. ; SFORCIN, J. M. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production: **J. Ethnopharmacol.** n. 87, p. 93-97, 2003.

SCHELLER, S. et al. The ability of ethanol extract of propolis to stimulate plaquelet formation in immunized mouse spleen cells. **Pharm. Res. Commun.** n. 20, p. 323-328, 1988.

SCHELLER, S. et al. Biological properties and clinical application of propolis I. **Arzneim. Forsch./Drug Res.**, n. 27, p. 889-890, 1977b.

SCHELLER, S. et al. Correlation between virulence of various strains mycobacteria and their susceptibility to ethanolic extract of propolis. **Z. Naturforsch.** n. 53, p. 1040-1044, 1998.

SCHELLER, S. et al. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma as compared to bleomycin. **Z. Naturforsch.** n. 44c, p. 1063-1065, 1989.

SCHELLER, S. et al. Biological properties and clinical application of propolis VI. **Arzneim. Forsch./Drug Res.** n. 27, pn 2138-2140, 1977a.

SCHELLER, S. et al. Free radical scavenging ethanol extract of propolis. **Int. J. Radiat. Biol.** n. 57, p. 41-465, 1990.

SCHIMIDT, J. O. Bee products - Chemical composition and application. **Internacional Conference on - Bee Products: Properties, applications e apitherapy**, Israel: The Israel Honey Production and Marketing Board and The Israel Beekeepers' Association, p. 33, 1996.

SCHIRMER, L. R. **Abelhas Ecológicas**. São Paulo: Nobel, 1986.

SCHULZE-OSTHOFF, K.; LOS, M.; BAEUERLE, P. A. Redox signalling by transcription factors NF- κ B and AP-1 in lymphocytes. **Biochem. Pharmacol.** n. 50, p. 735–741, 1995.

SEIFO, C. et al. Resveratrol and propolis as necrosis or apoptosis inducers in human prostate carcinoma. **Oncol. Res.** n. 14, p. 415-426, 2004.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. **Cell.** n. 47, p. 921-926, 1986.

_____. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell.** n. 46, p. 705–716, 1986.

SEO, K. W. et al. The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. **Phytother. Res.** n. 17, p. 250-253, 2003.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entree for resoleomics. **Rheum. Dis. Clin. North Am.** n. 30, p. 69-95, 2004.

SHIEH, D. B. et al. Properties of BK(Ca) channels in oral keratinocytes. **J. Dent. Res.** n. 84, p. 468-473, 2005.

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

SHIMIZU, K. et al. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. **Arch. Biochem. Biophys.** n. 424, p. 181-188, 2004.

SHINOHARA, R. et al. Evaluation of antilipid peroxidative action of propolis ethanol extract **Phytother. Res.** n. 16, p. 340-347, 2002.

SHUKLA, S.; BHADAURIA, M.; JADON, A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Indian J. Exp. Biol.** n. 42, p. 993-997, 2004.

SIES, H. **Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants.** Academic Press, London, 1991.

SILVA, F. B.; ALMEIDA, J. M.; SOUSA, S. M. Natural medicaments in endodontics -- a comparative study of the anti-inflammatory action. **Pesqui. Odontol. Bras.** n. 18, p. 174-179, 2004.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol. Rev.** n. 56, p. 387-437, 2004.

SIMOES, L. M. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J. Ethnopharmacol.** n. 94, p. 59-65, 2004.

SMITH, C.; PHILLIPS, N.; MILLER, C. Purification of charybidotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca^{+2} activated K^{+} channel. **J. Biol. Chem.** n. 261, p. 14607-14613, 1986.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.** n. 69, p. 145-82, 2000.

SONG, Y. S. et al. Inhibition of angiogenesis by propolis. **Arch. Pharm. Res.** n. 25, p. 500-504, 2002.

STEINBERG, D.; KAINE, G.; GEDALIA, I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacterial. **Am. J. Dent.** n. 9, p. 236-239, 1996.

STOKES, K. Y.; GRANGER D. N. The microcirculation: a motor for the systemic inflammatory response and large vessel disease induced by hypercholesterolaemia? **J. Physiol.** n. 20, p. 721-725, 2004.

SUD'INA, G. F. et al. Adhesive interactions of neutrophils and leukotriene synthesis. **FEBS Lett.** n. 336, p. 201-204, 1993.

SUGIMOTO, Y. et al. Inhibitory effects of propolis granular A P C on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. **Cancer Lett.** v. 25, n. 193, p. 155-159, 2003.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S.; ICHIKAWA, A. Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. **Progress in Lipid Research** n. 39, p. 289-314, 2000.

SUNDELL, C. L. et al. AGI-1067: A multifunctional phenolic antioxidant, lipid modulator, anti-inflammatory and anti-atherosclerotic agent. **JPET**. n. 6, p. 1040-1049, 2003.

SUSCHEK, C. V.; SCHNORR, O.; KOLB-BACHOFEN, V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? **Curr. Mol. Med.** n. 4, p. 763-775, 2004.

TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biol. Pharm. Bull.** n. 19, p. 966-970, 1996.

TAYLOR, E. L. et al. Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. **Cell Death Differ.** n. 10, p. 418-430, 2003.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. **J. Clin. Invest.** n. 108, p. 15-23, 2001.

TORRES D.; HOLLANDS I.; PALACIOS, E. Efecto de un extracto alcohólico de propóleos sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* in vitro. **Rev. Cubana Cienc. Vet.** n. 21, p. 15-19, 1990.

UGUR, A.; ARSLAN, T. An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. **J. Med. Food.** n. 7, p. 90-94, 2004.

UTO, Y. et al. First total synthesis of artemisinin established by o,o'-diprenylation of p-halophenols in water. **J. Org. Chem.** n. 67, p. 2355-2357, 2002.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A. et al. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J. Immunol. Methods.** n. 141, p. 15-22, 1991.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** n. 38, p. 97-120, 1998.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.** n. 44, p. 1-10, 1995.

VANGELISTI, M. **Própolis, pólen e geléia real**. Florianópolis: Primeiro curso nacional, 1986.

VERRÍSSIMO, M. T. L. **Tecnologia, industrialização e análise de própolis.** Florianópolis: EMPASC, 1980.

VILLANUEVA, V. R. et al. Les flavanoides de la propolis: isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine [dihydroxy- 5,7 flavanone]. **Ann. Inst. Pasteur.**, v. 118, p. 84-87, 1970.

VILLANUEVA, V. R. et al. Sur l' isolement et l' identification de la 3,5,7-trihydroxy flavone (galangine) a partir de la propolis. **Ann. Inst. Pasteur.**, v. 106, p. 292-302, 1964.

VOLPERT, R.; ELSNER, E. F. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytic enzymes, Germany: Lehrstuhl fuer Phytopathologie. **Arzneimittelforschung.** n. 46, p. 47-51, 1996 .

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine.** n. 7, p. 1-6, 2000.

WALKER, P.; CRANER , E. Constituents of propolis. **Apidologie**, n. 18, p. 327-334, 1987.

WANG, L. et al. Antiinflammatory effect of propolis. **Jap. J. Clin. Pharmacol. Therapy.** n. 24, p. 223-224, 1993.

WARNER, T. D. et al. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** n. 96, p. 7563–7568, 1999.

WINTER, C. A. The mechanism of action of non-steroid anti-inflammatory drugs. **Arzneimittelforschung.** n. 21, p. 1805-1811, 1971.

WISE, R.; KONSTANTINOVIC, P. Effectiveness of wart removal by compositions including propolis. **United States Patent no. US 5576005.** 1995.

WOMACK, M. D.; KHODAKHAH, K. Dendritic control of spontaneous bursting in cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.** n. 24, p. 3511-3521, 2004.

WOO, K. J. et al. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** n. 325, p. 1215-1222, 2004.

WOO, K. J. et al. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. **FEBS Lett.** n. 579, p. 705-711, 2005.

WOO, S. K. et al. Gastric mucosal binding studies with enprostil: a potent anti-ulcer prostaglandin. **Prostaglandins.** n. 32, p. 243-257, 1986.

WU, J. T.; KRAL, J. G. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. **J. Surg. Res.** n. 123, p. 158-169, 2005.

WU, C. Y. et al. Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK and nuclear factor-kappa B in interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocytes. **J. Neurochem.** n. 90, p. 1477-1488, 2004.

WU, P.; YE, L. Determination of effective components in propolis. **Wei Sheng Yan Jiu.** 2000 Mar, v. 30, n. 29(2), p. 123-124, 2000.

WULCZYN, F. G.; NAUMANN, M.; SCHEIDEREIT, C. Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of NF-kB. **Nature.** n. 358, p. 597-599, 1992.

XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **J. Leukoc. Biol.** n. 56, p. 576-82, 1994.

YAMAZAKI, S.; MUTA, T.; TAKESHIGE, K. A novel Ikb protein, Ikb- ζ , induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor-kB in the nuclei. **J. Biol. Chem.** n. 276, p. 27657-27661, 2001.

YOSHIDA, M.; SAITO, Y.; MATSUNO, T. Physiologically active substance. **United State Patent n°US5276177**, 1994.

YU, R. et al. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. **Carcinogenesis.** n. 18, p. 451-456, 1997.

YUHKI, K. et al. Prostaglandin receptors EP2, EP3, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** n. 311, p. 1218-1224, 2004.

ZECHNER, D. et al. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. **J. Cell Biol.** n. 139, p.115-127, 1997.

ZECHNER, D. et al. MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. **J. Biol. Chem.** n. 273, p. 8232–8239, 1998.

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** n. 6, p. 109–110, 1983.

ANEXOS

**ANEXO 1 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM AMOSTRAS DE PORÓPOLIS NO
MUNDO**

Compostos identificados em amostras de porópolis no mundo

GRUPO QUÍMICO	Nº	NOME USUAL
Amino acids	1	pyroglutamic acid
Aliphatic acids and their esters	2	butyric acid
	3	2-methylbutyric acid
	4	succinic acid
	5	crotonic acid
	6	angelic acid
	7	fumaric acid
	8	behenic acid
	9	acetic acid
	10	benzyl acetate
	11	isobutyl acetate
	12	isopentyl acetate
	13	isopentenyl acetate
	14	palmitic acid
	15	cerotic acid
	16	montanic acid
	17	stearic acid
	18	oleic acid
	19	linoleic acid
	20	isobutyric acid
	21	myristic acid
	22	lignoceric acid
	Aromatic acids and their esters	23
24		benzyl benzoate
25		protocatechulic acid
26		veratric acid
27		ethyl benzoate
28		methyl salicylate
29		benzyl salicylate

30	p-hidroxybenzoic acid
31	vanillic acid
32	p-anisic acid
33	methyl benzoate
34	cinnamyl benzoate
35	hydrocinnamic acid
36	cinnamic acid
37	caffeic acid
38	benzyl caffeate
39	2-methyl-2-butenyl caffeate
40	prenyl caffeate
41	3-methyl-3-butenyl caffeate
42	cinnamyl caffeate
43	phenylethyl caffeate
44	3,4-dimethoxycinnamic acid
	Artepillin C®
45	benzyl-3,4-dimethoxy-cinnamate
46	coumaric acid
47	benzyl coumarate
48	prenyl coumarate
49	3-methyl-3-butenyl-coumarate
50	phenyl ethyl coumarate
51	cinnamyl coumarate
52	isoferulic acid
53	benzyl isoferulate
54	2-methyl-2-butenyl-isoferulate
55	prenyl isoferulate
56	3-methyl-3-butenyl-isoferulate
57	phenylethyl isoferulate
58	cinnamyl isoferulate
59	ferulic acid
60	benzyl ferulate
61	prenyl ferulate

	62	3-methyl-3-butenyl-ferulate
	63	4-methoxycinnamic acid
Alcohols	64	Hydroquinone
	65	benzene methanol
	66	prenyl alcohol
	67	isobutenol
	68	phenethyl alcohol
	69	β -glycerophosphate
	70	α -glycerophosphate
	71	glycerol
	72	cinnamyl alcohol
Aldehydes	73	Benzaldehyde
	74	Protocatechualdehyde
	75	p-hydroxybenzaldehyde
	76	vanillin
	77	isovanillin
	78	caproic aldehyde
Chalcones	79	alpinetin chalcone
	80	pinostrobin chalcone
	81	pinobanksin-3-acetate-chalcone
	82	naringenin chalcone
	83	pinobanksin chalcone
	84	sakauranetin chalcone
Flavanones	85	Pinostrobin
	86	Pinocembrin
	87	pinobanksin-3-acetate
	88	pinobanksin-3-butyrate
	89	pinobanksin-3-hexanoate

	90	pinobanksin-3-methyl ether
	91	pinobanksin-3-pentanoate
	92	pinobankisin-3-pentenoate
	93	pinobankisin-3-propanoate
	94	sakauranetin
	95	pinobanksin
	96	naringenin
Flavones	97	Tectochrysin
	98	kaempferol-7,4'-dimethyl ether
	99	chrysin
	100	galangin-3-methyl ether
	101	apigenin-7-methyl ether
	102	galangin
	103	kaempferol-4'-methyl ether
	104	kaempferol-7-methyl ether
	105	apigenin
	106	kaempferol-3-methyl ether
	107	quercetin-3,7-dimethyl ether
	108	kaempferol
	109	fisetin
	110	rhamnetin
	111	quercetin
Ketones	112	Acetophenone
	113	p-acetophenone
Terpenoids and other compounds	114	Cymene
	115	Limonene
	116	α -copaene
	117	styrene
	118	1,8-cineole
	119	δ -cadinen
	120	guaiol
	121	α -copaen
	122	caryophylen

	123	β -selinen
	124	α -elemen
	125	calamenen
	126	α -muurolen
	127	γ -muurolen
	128	cadinen (isomer)
	129	β -eudesmol
	130	bulnesol
	131	isoeugenol
	132	
Hydrocarbons	133	3-methylinden
	134	alkilbenzol
	135	heneicosane
	136	tricosane
	137	pentacosane
	138	heptacosane
	139	nonacosane
	140	hentriacontane