

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES

**Própolis vermelha oriunda de *Dalbergia
ecastophyllum* L. Taub. (Paraíba, Brasil): avaliação da
toxicidade *in vitro* e *in vivo* e da atividade sobre bactérias
de importância odontológica**

**João Pessoa
2018**

MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES

**Própolis vermelha oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* L.
Taub. (Paraíba, Brasil): avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* e
da atividade sobre bactérias de importância odontológica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessôa

**João Pessoa
2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P813p Pontes, Marcela Lins Cavalcanti de.

Própolis vermelha oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* L
Taub (Paraíba, Brasil): avaliação da toxicidade in
vitro e in vivo e da atividade sobre bactérias de
importância odontológica / Marcela Lins Cavalcanti de
Pontes. - João Pessoa, 2018.

115 f. : il.

Orientação: Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz.

Coorientação: Pessoa, Hilzeth de Luna Freire.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Propolis vermelha. 2. Antimicrobiano. 3.
Antioxidante. 4. Toxicológico. 5. Odontologia. I.
Diniz, Margareth de Fátima Formiga de Melo. II. Pessoa,
Hilzeth de Luna Freire. III. Título.

UFPB/BC

MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES

**Própolis vermelha oriunda de *Dalbergia ecastophyllum*
L. Taub. (Paraíba, Brasil): avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* e da atividade sobre bactérias de importância
odontológica**

Aprovada em 05/02/2018

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora

Hilzeth de Luna Freire Pessoa

Prof^a. Dr^a. Hilzeth de Luna Freire Pessoa
(Universidade Federal da Paraíba)
Co-orientadora

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo

Profa. Dra. Caliandra Maria Bezerra Luna Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Externa

Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna

[Assinatura]

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno



Dedicatória

À **Deus**, pela oportunidade de conseguir chegar até aqui, debaixo de Sua misericórdia.



Agradecimentos

Ao meu filho **Arthur**, por realizar meu grande sonho de me tornar mãe e me mostrar que posso e consigo ser forte. Por trazer à tona o melhor de mim. Por me mostrar o maior e verdadeiro amor, sem vírgulas, sem poréns. Por ser tudo o que sempre sonhei e desejei. À você e por você, meu filho, todo esforço e dedicação.

Aos meus pais, **Vera e Fabiano**, meus primeiros mestres, por terem acreditado em mim e por me fazerem acreditar no real valor da vida, acreditar nas pessoas, acreditar que posso conquistar os meus sonhos se eles forem sonhados por Deus. Obrigada por serem meus maiores exemplos de dignidade e honradez, os quais me ajudam a vencer os desafios da vida.

Ao meu marido, **Adriano**, pelo companheirismo, parceria e incansável dedicação nesses últimos anos. Obrigada pelo presente que é sua companhia e por desfrutar comigo de uma verdadeira sintonia antes vista apenas em contos de fadas. Obrigada por estar sempre ao meu lado, enfrentando desafios e me ajudando a vencê-los. Obrigada pelo apoio, pelo amor e pela coragem de dizer SIM a tudo isso, sem pestanejar. Obrigada. Esta vitória também é sua.

Aos meus irmãos, **Ticiano e Manuelle**, aos meus cunhados **Gisele e Éllery** e aos meus sobrinhos **Natália, Samuel e Davi**, que sempre me apoiaram ao longo de toda essa trajetória acadêmica e compreenderam minha ausência em incontáveis situações. Obrigada pelo carinho, pela amizade, pelo amor e pela torcida.

À minha família científica **LABETOX** à qual nutro um carinho imenso. Obrigada pelos ensinamentos, pela parceria, pelo companheirismo, pela paciência ao longo desses últimos anos. Estamos aumentando nossa bagagem com muita experiência e coisa boa para contar! Obrigada pelo acolhimento e pela oportunidade do convívio.

À minha **turma de doutorado**, pelas inúmeras conversas, pelas risadas, pela alegria, pelos desabafos, por compartilharmos os mesmos anseios e os mesmos desafios, nos fortalecendo juntos. Obrigada pelo carinho de sempre.

À **Edivaldo Pacheco**, por ter acreditado neste trabalho e fornecer nossa matéria-prima, a própolis vermelha bruta, sem a qual inviabilizaria a realização destes experimentos.

À **Profa. Dra. Isabella Passos**, pelo carinho, atenção, pelos experimentos, ensinamentos e pelas publicações que ainda faremos juntas. Obrigada!

À **Profa. Dra. Horacinna Cavalcanti**, pelas viagens, conversas, pela paciência, carinho e cuidado com esse experimento.

Ao **Prof. Dr. Elquio Eleamen**, pela prestativa ajuda nas análises de cromatografia e por estar sempre à disposição quando precisávamos.

À **Profa. Dra. Andressa Oliveira**, por sempre ter sido grande exemplo de profissional e pesquisadora. Obrigada pelo carinho, cuidado e confiança depositada neste experimento.

À **Zilmara**, técnica do LABETOX, sempre prestativa, obrigada pela amizade, colaboração, companheirismo, alegria e por compartilhar dúvidas e conhecimentos.

À **Alexandre**, técnico do LABIAL, pelo cuidado e carinho nos serviços prestados.

À **Crispim**, técnico do Biotério Thomas George, pela inestimável ajuda com os animais. Obrigada por utilizar sua experiência e paciência neste experimento.

À **Marcelino**, técnico do laboratório de Histologia, pela paciência e dedicação nos serviços prestados.

A todos os **professores** do doutorado, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas.

À **Coordenação** e aos **funcionários** do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela competência, seriedade e apoio necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

À **CAPES** e à **UFPB** pelo apoio financeiro e estrutural para o desenvolvimento deste estudo.



Agradecimentos Especiais

À minha orientadora, **Profa. Dra. Margareth de Fátima Formiga de Melo Diniz**, que acreditou em mim e no meu trabalho. Obrigada pelo exemplo de profissionalismo, seriedade e ética e por estar sempre à disposição quando precisei de sua orientação.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessoa**, uma verdadeira mestre. Uma pessoa de coração imenso, uma profissional ética, uma pesquisadora exemplar. Obrigada pela amizade, pela experiência, por tornar essa bagagem do doutorado mais leve e harmoniosa por tratar tudo com amor e carinho. Quero estar sempre por perto, seja publicando, experimentando, ouvindo ou falando. Conviver com a Sra. foi motivo de muito orgulho para mim. Obrigada.

Aos professores **Caliandra Bezerra, Edeltrudes Lima, Fábio Sampaio e José Maria Barbosa Filho**, por terem aceitado o convite de participar da banca do doutorado, contribuindo significativamente com meu trabalho. Vocês foram escolhidos com muito critério e com muito carinho. Obrigada por participarem deste momento tão especial para mim.

*"Os rios não bebem sua própria água; as árvores não comem seus próprios frutos.
O sol não brilha para si mesmo; e as flores não espalham sua fragrância para si.
Viver para os outros é uma regra da natureza.
A vida é boa quando você está feliz; mas a vida é muito melhor quando os outros estão
felizes por sua causa."*

Papa Francisco



Resumo e Abstract

RESUMO

Pontes, M.L.C. Própolis vermelha oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub. (Paraíba, Brasil): avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* e da atividade sobre bactérias de importância odontológica. 2018. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia). CCS/UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Foram estudados os efeitos farmacológicos e toxicológicos do Extrato hidroalcoólico de Própolis Vermelha Brasileira (EPVP) oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* (Paraíba, Brasil). Foi realizada a cromatografia em camada delgada para a caracterização de seus compostos majoritários. Na realização dos estudos antimicrobianos *in vitro*, utilizaram-se diferentes cepas bacterianas de crescimento planctônico e não-planctônico, a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EPVP isolado e em associação à clorexidina (Clx). Na realização dos estudos toxicológicos do EPVP, foram realizados ensaios de atividade antioxidante e citotoxicidade utilizando-se hemácias humanas obtidas do banco de sangue do Hospital Universitário Lauro Wanderley. Foi realizado ainda o *Brine Shrimp Test* utilizando larvas de *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo da classe Anostracea na forma de metanúplio, além do teste de toxicidade em membrana corioalantóide utilizando ovos de galinha fertilizados, observando sinais de alteração vascular. Nos ensaios *in vivo*, utilizou-se camundongos da espécie *Swiss*, oriundos do Biotério Thomas George/UFPB e foi avaliada a genotoxicidade e toxicidade aguda do EPVP. Os experimentos de atividade antibacteriana revelaram que o EPVP apresentou atividade contra espécies do gênero *Streptococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM variando entre 62,5 e 125 µg/mL e CBM variando entre 250 e 500 µg/mL. No teste de associação com Clx, a CIM das substâncias diminuiu até 16 vezes, apresentando sinergismo contra *S. mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius*. O EPVP demonstrou possuir potente atividade antibiofilme contra espécies de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis* e multiespécie. O EPVP em concentrações até 500 µg/mL não induziu a morte em *A. salina* nem provou ser irritante no teste de membrana corioalantóide em ovo de galinha, pois não conseguiu promover vasoconstrição, hemorragia ou coagulação na vascularização. Além disso, o EPVP induziu hemólise fraca (< 45%) a 500 µg/mL em todos eritrócitos tipo A, B e O, inibiu a oxidação induzida por fenilhidrazina e não promoveu a oxidação da hemoglobina. Também não foram detectados micronúcleos em eritrócitos dos roedores que utilizaram EPVP. Na avaliação da toxicidade aguda, após a administração oral do EPVP pôde-se observar que o composto em estudo não induziu alterações comportamentais nem alterou o consumo de ração dos animais tratados, sem modificar o peso corporal, peso dos órgãos e os parâmetros bioquímicos avaliados. Em conclusão, estes resultados sugerem que o EPVP apresenta atividade antibacteriana, com baixa potência citotóxica, toxicológica e genotóxica.

Palavras-chave: Propolis vermelha, antimicrobiano, biofilme, antioxidante, citotóxico, toxicológico, odontologia.

ABSTRACT

Pontes, M.L.C. Red propolis from *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub. (Paraíba, Brazil): evaluation of in vitro and in vivo toxicity and activity on bacteria of dental importance. 2018. Thesis (Doctorate in Natural and Synthetic Bioactive Products, area of concentration: Pharmacology). CCS / UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

The pharmacological and toxicological effects of the Ethanol extract of Brazilian Red Propolis (EPVP) from João Pessoa (Paraíba, Brazil) were studied. Thin layer chromatography was used to characterize its major compounds. In order to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the EPVP alone and in combination with Chlorhexidine (Clx), different in vitro antimicrobial studies were used. In carrying out the toxicological studies of the EPVP, tests of antioxidant activity and cytotoxicity were carried out using human red blood cells obtained from the Lauro Wanderley University Hospital blood bank. In the in vivo toxicity studies, the Brine Shrimp Test was performed using larvae of *Artemia salina* L., a microcrustacean of the class Anostraca in the form of methanupium, in addition to the chorioallantoic membrane toxicity test using fertilized chicken eggs, observing signs of vascular alteration. In the mouse assays, the Swiss species from the Thomas George / UFPB Biotarium were used and the genotoxicity and acute toxicity of the EPVP were evaluated. The antimicrobial activity experiments showed that EPVP promoted an antibacterial effect against species of the genus *Streptococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*, with MIC ranging from 62.5 to 125 µg/mL and CBM ranging from 250 to 500 µg/mL. In the Clx association test, the substances MIC decreased by up to 16 fold, exhibiting synergism against *S. mutans*, *S. oralis* and *S. salivarius*. EPVP has been shown to have a potent antibiofilm effect against *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis* and multispecies. EPVP at concentrations up to 500 µg/mL did not induce death in *A. salina* nor did it prove to be an irritant in the chorioallantoic membrane test in chicken eggs as it failed to promote vasoconstriction, hemorrhage or coagulation in the vascularization. In addition, EPVP induced weak hemolysis (<45%) at 500 µg / mL in all type A, B and O erythrocytes, inhibited phenylhydrazine-induced oxidation, and did not promote hemoglobin oxidation. Also, no micronuclei were detected in erythrocytes of rodents that used PLEV. In the evaluation of acute toxicity, after the oral administration of the EPVP, it was observed that the compound under study did not induce behavioral alterations nor did it alter the feed consumption of treated animals, without changing body weight, organ weight and biochemical parameters evaluated. In conclusion, these results suggest that EPVP is made antibacterial, with low cytotoxic, toxicological and genotoxic potency.

Keywords: Red propolis, antimicrobial, biofilm, antioxidant, cytotoxic, toxicological, dentistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química dos flavonóides.....	30
Figura 2	(A) <i>Dalbergia ecastophyllum</i> , a origem botânica da propolis vermelha; (B) Pigmento avermelhado no cerne da <i>D. ecastophyllum</i> ; (C) Abelhas <i>A. mellifera</i> coletando exsudato colorido na superfície de <i>D. ecastophyllum</i>	32
Figura 3	Estrutura química do Gluconato de clorexidina.....	41
Figura 4	Esquema para demonstração de placas cromatográficas e orientação das bandas.....	49
Figura 5	Bandas de coloração alaranjada, características da classe dos flavonóides presentes na própolis vermelha da Paraíba.....	64
Figura 6	Mortalidade dos nauplios de <i>Artemia salina</i> expressa em termos de percentagem em relação à concentração de extrato de própolis vermelha da Paraíba.....	72
Figura 7	Hemólise em eritrócitos dos tipos sanguíneos A,B e O induzida pelo EPVP.....	75
Figura 8	Atividade anti-hemolítica de EPVP contra eritrócitos dos tipos A, B e O na presença de solução hipotônica de NaCl (0,24%).....	77
Figura 9	Atividade oxidante de EPVP sobre hemoglobina humana.....	79
Figura 10	Atividade antioxidante de EPVP sobre hemoglobina humana.....	80
Figura 11	Biocompatibilidade do EPVP com a membrana corioalantóide de ovo de galinha.....	82
Figura 12	Fotomicrografia óptica ilustrativa de eritrócitos micronucleados (seta) em sangue periférico de camundongos Swiss na presença da ciclofosfamida (50mg/Kg) (1000X).....	84
Figura 13	Infiltrado inflamatório parenquimatoso leve foi observado nos rins de camundongos tratados com EPVP 2000 mg/Kg (400x).....	89
Figura 14	Não foi evidenciado sinal de infiltrado inflamatório em fígado de camundongos tratados com EPVP 2000 mg/Kg (400x).....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais componentes químicos e atividades biológicas da própolis vermelha brasileira.....	33
Tabela 2	Sistemas de eluicao utilizados a partir dos padrões para fornecer metabólitos.....	50
Tabela 3	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato da Própolis Vermelha da Paraíba (EPVP) e da clorexidina em diferentes espécies bacterianas.....	66
Tabela 4	Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e Tipo de interação do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha da Paraíba (EPVP) em associação à clorexidina – CLX.....	69
Tabela 5	Atividade antibacteriana do EPVP contra biofilme monoespécie de <i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> e multispecie expressa em termos de percentagem da sobrevida em relação à clorexidina.....	71
Tabela 6	Atividade anti-hemolítico da alta concentração de EPVP em eritrócitos de tipo A, tipo B e tipo O na presença de NaCl.....	76
Tabela 7	Atividade oxidante do EPVP sobre hemoglobina humana.....	79
Tabela 8	Atividade antioxidante do EPVP sobre hemoglobina humana.....	80
Tabela 9	Biocompatibilidade do EPVP com a membrana corioalantóide de ovo de galinha.....	81
Tabela 10	Frequência de micronúcleos em 2000 eritrócitos de sangue periférico de camundongos de diferentes grupos experimentais.....	84
Tabela 11	Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com Própolis Vermelha na dose de 2000mg/Kg.....	86
Tabela 12	Efeitos do tratamento agudo com EPVP na avaliação do peso inicial e final e consumo de água e ração pelos camundongos.....	87
Tabela 13	Efeitos do tratamento agudo com EPVP na avaliação dos órgãos dos camundongos.....	87
Tabela 14	Efeitos do tratamento agudo com EPVP em parâmetros bioquímicos: glicemia, colesterol triglicerídeos e albumina em camundongos.....	88
Tabela 15	Efeitos do tratamento agudo com EPVP em parâmetros bioquímicos uréia, ácido úrico, ALT e AST de camundongos.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classe de metabólitos e padrão utilizado para apresentar os compostos bioativos.....	65
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Alanina-aminotransferase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST – Aspartato-aminotransferase

ATCC – American Type Culture Collection

CEP/HULW – Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLX – Clorexidina

DMSO – Dimetilsulfóxido

EPVP – Extrato de Propolis Vermelha da Paraíba

Hb – Hemoglobina

MetHb – Metahemoglobina

PgPNSB – Programa de Pós-graduação em produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

PBS – Tampão fosfato salino

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1	Produtos Naturais.....	25
2.2	Própolis.....	28
2.3	Propolis vermelha.....	31
2.4	Biofilme dental.....	38
2.5	Antimicrobianos em Odontologia.....	40
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	Objetivo Geral.....	44
3.2	Objetivos Específicos.....	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	Locais de trabalho.....	47
4.2	Posicionamento Ético.....	47
4.3	Delineamento experimental – fluxograma.....	48
4.4	Obtenção e preparação das substâncias teste.....	48
4.5.	Animais.....	49
4.6	Caracterização química.....	49
4.6.1	Cromatografia em camada delgada.....	50
4.7	Avaliação antibacteriana do EPVP.....	51
4.7.1	Meios de cultura.....	51
4.7.2	Cepas bacterianas.....	51
4.7.3	Inóculo bacteriano.....	51
4.7.4	Antimicrobiano licenciado.....	52

4.7.5	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	52
4.7.6	Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	53
4.7.7	Determinação da concentração inibitória fracionada (CIF).....	53
4.7.8	Determinação da atividade antibiofilme.....	54
4.8	Avaliação da toxicidade do EPVP.....	55
4.8.1	Determinação da toxicidade em <i>Artemia salina</i> Leach.....	55
4.8.2	Avaliação da citotoxicidade do EPVP.....	56
4.8.2.1	Eritrócitos humanos.....	56
4.8.2.2	Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos.....	56
4.8.2.3	Determinação da atividade anti-hemolítica em eritrócitos humanos.....	57
4.8.2.4	Determinação da atividade oxidante e antioxidante em hemoglobina humana.....	57
4.8.3	Determinação da atividade coagulante, vasoconstrictora e hemorrágica em membrana corioalantóide de ovo de galinha.....	58
4.8.4	Avaliação da genotoxicidade do EPVP.....	59
4.8.4.1	Determinação da atividade clastogênica e aneugênica em eritrócitos de camundongos.....	59
4.8.5	Avaliação da toxicidade aguda do EPVP.....	60
4.9	Análise estatística.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	Caracterização química.....	64
5.1.1	Cromatografia em camada delgada.....	64
5.2	Avaliação antibacteriana do EPVP.....	66
5.2.1	Determinação das concentrações inibitória mínima e bactericida mínima....	66

5.2.2	Determinação da concentração inibitória fracionada.....	68
5.2.3	Determinação da atividade antibiofilme.....	70
5.3	Avaliação da toxicidade do EPVP.....	72
5.3.1	Determinação da toxicidade em <i>Artemia salina</i> Leach.....	72
5.3.2	Avaliação da citotoxicidade do EPVP.....	73
5.3.2.1	Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos.....	73
5.3.2.2	Determinação da atividade anti-hemolítica em eritrócitos humanos.....	76
5.3.2.3	Determinação da atividade oxidante e antioxidante em hemoglobina humana.....	78
5.3.3	Determinação da atividade coagulante, vasoconstrictora e hemorrágica em membrana corioalantóide de ovo de galinha.....	81
5.3.4	Avaliação da genotoxicidade do EPVP.....	82
5.3.4.1	Determinação da atividade clastogênica e aneugênica em eritrócitos de camundongos.....	82
5.3.5	Avaliação da toxicidade aguda do EPVP.....	85
6	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
	ANEXOS	
	ANEXO 1 - Certidão CEP HULW	
	ANEXO 2 – Certidão CEUA	



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A população microbiana da cavidade bucal humana é bastante diversificada. Entre todas as cepas microbianas, bactérias anaeróbicas Gram-negativas e *Streptococci* Gram-positivos são os principais tipos na microbiota normal da boca humana (SAMARANAYAKE; MATSUBARA, 2017). Tais micro-organismos estão diretamente envolvidos no processo infeccioso bucal, incluindo cárie, periodontite, infecções endodônticas, osteíte alveolar e amigdalite. Além disso, eles têm uma probabilidade significativa de propagação em superfícies epiteliais contíguas para locais vizinhos. Estudos demonstraram a ligação entre micro-organismos da microbiota bucal e uma série de doenças sistêmicas, incluindo doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, parto prematuro, diabetes e pneumonia (AAS et al., 2005; AGWU et al., 2015).

Como parte desse processo, na busca científica por novos antimicrobianos deve-se enfatizar aqueles derivados de produtos naturais, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitos produtos naturais já vêm sendo vastamente testados e usados há centenas de anos com as mais diversas finalidades (CARVALHO, 2003).

O uso da própolis para fins medicinais data de tempos remotos e o interesse pelo seu uso terapêutico tem-se exacerbado a partir do aprofundamento de estudos e comprovações científicas relativas à sua aplicação na promoção da saúde e prevenção de doenças pelas inúmeras atividades biológicas a ela atribuídas: antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, cicatrizante, hepatoprotetora, antitumoral e imunomodulatória (BANKOVA et al., 2005; ALENCAR et al., 2007). Na Odontologia, esta substância é utilizada com maior frequência na prevenção e tratamento de lesões e infecções bucais, gengivites e também como antimicótico e cicatrizante (SARDANA et al., 2013).

No Brasil, os produtos contendo própolis foram classificados como opoterápicos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Estes medicamentos são preparações obtidas a partir de glândulas, tecidos e secreções animais com finalidade terapêutica ou medicinal. Enquadram-se na categoria de medicamentos específicos por se tratar de substâncias isoladas ou associadas entre si e/ou a derivados vegetais e/ou vitaminas e/ou minerais e/ou aminoácidos e/ou

proteínas e/ou fitofármaco, segundo a Resolução RDC nº. 97 de 01 de Agosto de 2016 (BRASIL, 2016).

A própolis brasileira tem se tornado objeto de grande interesse por parte dos pesquisadores, pois suas amostras tropicais tem demonstrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis de zonas temperadas (TRUSHEVA et al., 2006 ; LEVYA; MESA, 2007).

O Brasil é um grande produtor e exportador de própolis coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* (OLDONI et al., 2015). Na última década foi identificado um novo tipo de própolis produzida a partir da resina de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. conhecida como própolis vermelha devido à sua coloração avermelhada (SILVA et al., 2008). Segundo Pontes et al. (2018), esta substância se apresenta de forma promissora no desenvolvimento de pesquisas em saúde, agregando benefício clínico e comercial.

Sabendo-se da importância da descoberta de produtos naturais com efeitos terapêuticos, aliado aos poucos estudos científicos envolvendo própolis vermelha do nordeste brasileiro, este estudo teve como objetivo principal avaliar as propriedades farmacológicas e toxicológicas da própolis vermelha da cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil, oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub.



Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias primas para a síntese ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2014).

O uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, prática de cura milenar que está em processo de crescimento desde meados do século passado, passou a ser algo considerado terapêutica pertinente a ser implementada nos serviços do Sistema Único de Saúde no Brasil (SUS) (BRASIL, 2006).

Dessa forma, no ano 2006, foram criadas a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) envolvendo a Fitoterapia, a Homeopatia, a Medicina Tradicional Chinesa/Acupuntura e o Termalismo/Crenoterapia, e a Política Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006). Mais recentemente, no ano 2017, foram incluídas no rol de procedimentos do SUS as práticas da arteterapia, meditação, musicoterapia, tratamento naturopático, tratamento osteopático, tratamento quiroprático, reiki, shantala, terapia comunitária integrativa e yoga (BRASIL, 2017). A criação de uma política de âmbito nacional para a Fitoterapia colocou para os estados e para os municípios brasileiros a oportunidade e a obrigação legal de fazer sua implementação no âmbito local (BRASIL, 2006).

Esta implementação, além de possibilitar mais uma forma de tratar as doenças, facilitou o acesso ao tratamento, em termos econômicos e de praticidade, além de reforçar o exercício da cidadania por possibilitar aos usuários o uso de uma terapêutica que consideram mais adequada e mais saudável. Por este entendimento, ela reforça o papel do SUS como um sistema capaz de atender às demandas da população, favorecendo a utilização da fitoterapia pelos diferentes profissionais da saúde com enfoques variados, multiplicando suas aplicações e benefícios. É uma prática que incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (BRASIL, 2012).

Dentre os produtos naturais, a própolis tem se destacado tanto pelas diversas propriedades biológicas (ALENCAR et al., 2007; CASTRO et al., 2007;

OLDONI et al., 2011) quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de vários produtos (GIUSTI et al., 2004).

Estudos sobre o uso e a aplicação da própolis já foram realizados em diferentes especialidades da Odontologia, entre elas a Cariologia, a Cirurgia, a Endodontia, a Ortodontia e a Periodontia, sendo utilizada tanto em gengivites, periodontites, aftas e mumificação pulpar quanto em curativos pré e pós-cirúrgicos e em tratamentos da candidose, herpes labial e em higiene bucal. Este produto natural revela-se de grande interesse para o tratamento das doenças bucais (MANARA et al., 1999). O emprego de produtos naturais na clínica odontológica tem sido justificado pelo uso popular, por seu baixo custo e pelos efeitos farmacológicos a eles associados (OLIVEIRA et al., 2007).

O surgimento do conceito “natural” em muito contribuiu para a disseminação dos produtos naturais nas últimas décadas. Para muitas pessoas esse conceito significa a “ausência de produtos químicos”, que são aqueles que podem causar algum dano ou que, de alguma forma, representam perigo. Assim, produtos naturais passaram a ser sinônimos de saudáveis, seguros e benéficos (MENGUE et al., 2001). Porém, o uso milenar de produtos naturais mostrou, ao longo dos anos, que determinados produtos apresentam substâncias potencialmente perigosas. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas delas possuem substâncias agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas respeitando os riscos toxicológicos (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Dessa forma, se faz necessária a avaliação da relação entre a atividade farmacológica *versus* toxicidade de um determinado produto natural para verificar sua aplicabilidade terapêutica através de estudos científicos para que a população tenha acesso a uma terapia alternativa segura e de qualidade.

Na avaliação da toxicidade *in vitro*, um dos modelos experimentais bastante utilizados é o ensaio de citotoxicidade em eritrócitos. Esse teste é um método de triagem para toxicidade de novas drogas a fim de estimar o dano que elas podem produzir *in vivo* em eritrócitos, já que a membrana eritrocitária é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com medicamentos (SCHREIER et al., 1997; APARICIO et al., 2005).

Cada vez mais se tem aderido aos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa com produtos naturais. Dentre esses bioensaios, destaca-se o ensaio de toxicidade geral frente *Artemia salina* Leach, que é um microcrustáceo de água salgada. A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que, tais ensaios de toxicidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (LUNA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008).

A literatura relata uma correlação entre a toxicidade geral frente *A. salina* e atividades antifúngica, viruscida e antimicrobiana (MACRAE; HUDSON; TOWERS, 1988) e também entre a citotoxicidade em linhagens de células tumorais humanas (MCLAUGHLIN et al., 1991).

Além destes, são conduzidos ensaios avaliativos da capacidade de determinadas substâncias em promover ou suprimir a ação angiogênica em testes utilizando a membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha. Este teste é utilizado em grande escala devido ao seu baixo custo e facilidade na execução, apresentando grande aceitação científica, sendo crescente o número de trabalhos utilizando essa técnica para se avaliar substâncias diversas (KATRANCIOGLU et al., 2012).

Grande parte dos trabalhos envolvendo estudos não-clínicos *in vivo* de produtos naturais e sintéticos, baseados em regulamentações nacionais e internacionais, utilizam parâmetros bioquímicos e anatomopatológicos para avaliar possíveis sinais de toxicidade (OLIVEIRA et al., 2007).

Nesse contexto, destacam-se os estudos de toxicidade aguda não-clínica, que avaliam a toxicidade após exposição a uma dose única ou dose fracionada administrada no período de 24 horas. São obrigatórios para todo tipo de material em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidenciam o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las, permitindo dessa forma conhecer o índice de letalidade, a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste, os órgãos alvo, as alterações comportamentais e os sinais que precedem a morte (LARINI, 1999). Nesses estudos farmacológicos/ toxicológicos, após exposição às drogas, são analisados parâmetros que avaliam possíveis alterações na função hepática, como as

transaminases, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); função renal, como uréia e creatinina, bem como nos parâmetros hematológicos como o eritrograma, leucograma e plaquetograma. Ainda, exames anatomopatológicos (macro e microscópicos) são de extrema importância, pois analisam estrutura e função, em nível celular (HENRY, 2008).

2.2 Própolis

A origem do conhecimento do homem sobre as propriedades alimentícias, curativas e profiláticas dos produtos das abelhas remontam ao Egito antigo e à Mesopotâmia. A história da medicina das civilizações antigas contém, seus escritos, centenas de receitas em que foram utilizados mel, própolis, larvas de abelhas e até as próprias abelhas para curar ou prevenir enfermidades. Praticamente todas as civilizações antigas conheceram e utilizaram os produtos apícolas como valiosos recursos terapêuticos. Os Egípcios conheciam as propriedades conservantes da própolis e a utilizavam para embalsamar os mortos. Os gregos, entre os quais Hipócrates, adotaram a própolis como cicatrizante de feridas internas e externas. Por ser um antibiótico natural, mais tarde, persas, romanos e incas também fizeram uso desta substância para tratar infecções (PEREIRA et al., 2002). Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores, enquanto a elite feminina da época utilizava este produto no alívio da síndrome pré-menstrual e de cólicas (LUSTOSA, 2008).

A própolis já era descrita no século XVI, na França. Os médicos europeus do século XVI, especialmente russos e poloneses, utilizaram a própolis como antibacteriano, tuberculostático e agente dermatológico antiacne. Na Odontologia, foi empregada no tratamento de abscessos e gengivas hemorrágicas, bem como nos casos de candidíases bucais e halitoses. A farmacopéia inglesa do século XVII registrou a própolis como um remédio oficial. Entre os séculos XVII e XX, esta substância tornou-se popular na Europa, principalmente por sua propriedade antibacteriana (CASTALDO; CASPASSO, 2002; LUSTOSA, 2008).

Ao final do século XIX, na África do Sul, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em

clínicas soviéticas (MARCUCCI, 1995). Na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), a própolis mereceu atenção especial na medicina e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento de tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (PEREIRA et al., 2002).

O termo 'própolis' deriva do grego *pro* "em frente de, na entrada de", e *polis*, "comunidade ou cidade" (CASTALDO; CAPASSO, 2002; SALATINO et al., 2005; ALENCAR et al., 2007). Esta substância é utilizada pelas abelhas como um material para vedação de frestas e orifícios, impedindo a entrada de luz e a presença de micro-organismos, ao mesmo tempo em que promove isolamento térmico e a diminuição da umidade. É utilizada também para forrar os favos, de modo a permitir a deposição de ovos pela abelha rainha e para embalsamar pequenos animais mortos (besouros e insetos) que as abelhas não conseguiram tirar da colméia, evitando sua putrefação, o que poderia causar-lhes infecções e doenças (MARCUCCI et al., 1995; BURDOCK et al., 1998; KOO et al., 2000; SALATINO et al., 2005).

A própolis é um material quebradiço quando frio e se torna dúctil e maleável quando aquecido. Seu ponto de fusão é variável entre 60 e 70 °C, sendo que pode atingir em alguns casos até 100 °C. Possui propriedades elásticas e pode se distender em até 200% antes de se romper (INOUE, 2007).

A coloração da própolis é dependente de sua procedência, sendo encontrada em tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro, dependendo da flora de origem. Possui também um aroma forte e característico em consequência da fração volátil dos seus ácidos fenólicos, podendo variar de uma amostra para outra (INOUE, 2007; PEREIRA et al., 2002; LUSTOSA et al., 2008). A principal origem botânica da própolis verde é a *Bacharis dracunculifolia*, conhecida como alecrim do campo, é rica em artepilina C e o seu teor de flavonóides é relativamente baixo (PEREIRA et al., 2002; SALATINO et al., 2005; BERRETTA et al., 2017). A própolis amarela, de provável origem botânica *Populus* spp., contém triterpenoides pertencentes ao oleanano, lupano, ursano e lanostano (CUESTA-RUBIO et al., 2007). Já a própolis marrom tem como origem botânica principal a *Araucaria*, embora muitos compostos

também estejam presentes em *Bacharis dracunculifolia* (SALATINO et al., 2005; BERRETTA et al., 2017).

A composição química da própolis é complexa, heterogênea, com mais de 300 constituintes, dentre esses: ácidos graxos e ácidos fenólicos, ésteres, flavonóides, terpenos, aldeídos, alcoóis aromáticos e naftaleno que exercem uma importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas (BURDOCK, 1998; PEREIRA et al., 2002; LUSTOSA, 2008). Os principais constituintes são os compostos fenólicos, que se caracterizam pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. Os compostos fenólicos são representados majoritariamente pelos flavonóides (flavonas, flavonóis e isoflavonas) (BURDOCK, 1998; HAYACIBARA et al., 2005). A grande maioria desses compostos possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, apresentando um núcleo característico C6-C3-C6. Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (BALANSUNDRAM et al., 2006), de acordo com a Figura 1.

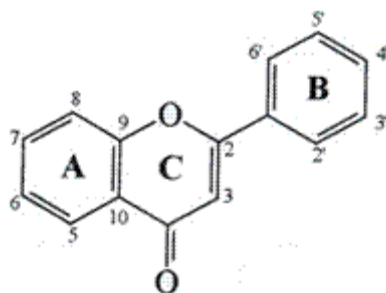


Figura 1. Estrutura química dos flavonóides

Baseado nas propriedades físico-químicas (cor, textura, composição química) e devido à diversidade da flora brasileira, pôde-se classificar as própolis produzidas no Brasil em 12 grupos distintos (PARK et al., 2002). Em 2007, um novo tipo de própolis foi descrito na literatura e tem ganhado espaço entre os pesquisadores. Trata-se do 13º tipo de própolis brasileira, a própolis vermelha (ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2008).

2.3 Própolis vermelha

A própolis vermelha caracteriza-se por ter como origem botânica a resina da espécie *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub., uma espécie de leguminosa da família Fabaceae (LÓPEZ et al., 2014). Além do Brasil, a propolis vermelha também tem sido descrita em Cuba (PICCINELLI et al., 2011), México (LOTTI et al., 2010) e Venezuela (TRUSHEVA et al., 2006) e possuem a mesma origem botânica.

D. ecastophyllum, popularmente conhecida como rabo - de - bugio ou marmelo - do - mangue, é uma espécie escandente ou semi-prostrada, encontrada associada a estuários, mangues e dunas, onde auxilia na fixação da areia. É bem adaptada a condições de alta salinidade e seus frutos são capazes de flutuar. A área de ocorrência da *D. ecastophyllum* é muito vasta, e se estende desde o sul da Flórida (EUA) ao sul do Brasil, assim como na costa ocidental da África. No Brasil, tem como domínios fitogeográficos a Amazônia e a Mata Atlântica, abrangendo as regiões Norte (Roraima, Pará e Amazonas), Nordeste (Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe), Centro - Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Santa Catarina) (CAMARGO, 2005).

No Brasil, esta espécie é conhecida por seu pigmento vermelho intenso (PICCINELLI et al., 2011). As abelhas *A. mellifera* coletam o exsudato vermelho dos orifícios feitos por insetos na superfície do tronco de *D. ecastophyllum* para fabricar a própolis (BUENO-SILVA et al., 2013a) (Figura 2).

Park et al. (2002) afirmaram que o melhor indicador da origem botânica da própolis é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal. A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia hospedeira, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica.



Figura 2. (A) *Dalbergia ecastophyllum*, a origem botânica da própolis vermelha. (B) Exsudato avermelhado no cerne da *D. ecastophyllum*. (C) Abelhas *Apis mellifera* utilizando a própolis vermelha para fechar frestas e orifícios. Fotos: Edivaldo Pacheco Filho

Diferente dos demais tipos de própolis, ricas sobretudo em ácidos fenólicos e ésteres (PELLATI et al., 2011), a própolis vermelha possui uma composição química específica e apresenta novos componentes nunca antes reportados em outras variedades de própolis, responsáveis por inúmeras atividades biológicas (Tabela 1) (WANG et al., 2004; MILITAO et al., 2005; RUFER; KULLING, 2006; ALENCAR et al., 2007; PICCINELLI et al., 2011; BUENO-SILVA et al., 2013a).

O mecanismo de atividade antibacteriano e antibiofilme da própolis vermelha pode ser atribuído principalmente ao dano à membrana citoplasmática causado pela menor fluidez da membrana, à inibição da síntese de ácido nucléico causado pela inibição da topoisomerase, à inibição do metabolismo causado pela inibição do NADH-citocromo c-redutase e à inibição da formação de biofilme (BUENO-SILVA et al., 2013a; YIXI, 2015).

A atividade antioxidante desta substância está relacionada à prevenção da formação, neutralização e remoção de radicais livres associado à inibição da cadeia de reações oxidativas pela própolis vermelha (FROZZA et al., 2013).

Referente à atividade antifúngica, o efeito da própolis vermelha parece estar associado ao dano causado na membrana fúngica, afetando o ergosterol da membrana e alterando sua permeabilidade (PIPPI et al., 2015).

Tabela 1. Principais componentes químicos e atividades biológicas da própolis vermelha brasileira (Adaptado de Pontes et al., 2018)

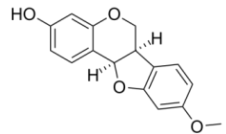
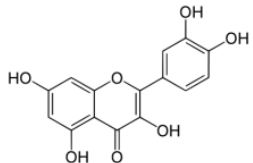
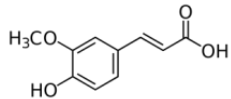
COMPONENTE QUÍMICO	FONTE (Extrato/Fração)	ORIGEM GEOGRÁFICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
Medicarpina 	Extrato etanólico	Maceió (AL)	Antibacteriana/ antifúngica	Trusheva et al. (2006); Alencar et al. (2007); Piccinelli et al. (2011); Frozza et al. (2013)
Quercetina 	Extrato etanólico/ Fração clorofórmica	Maceió (AL)	Anti- inflamatória	Alencar et al. (2007)
Ácido ferúlico 	Extrato etanólico/ Fração clorofórmica	Maceió (AL)	Antioxidante	Alencar et al. (2007)

Tabela 1. (Continuação)

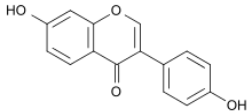
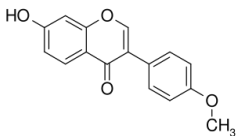
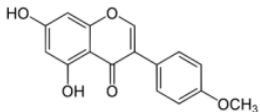
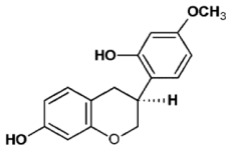
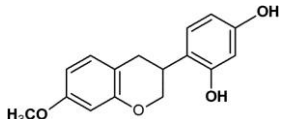
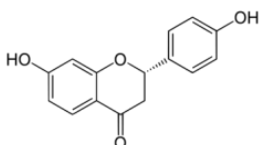
Daidzeína 	Extrato etanólico/ Fração clorofórmica	Maceió (AL)	Antioxidante	Alencar et al. (2007)
Formononetina 	Extrato etanólico	Maceió (AL)	Antiproliferativa	Lotti et al. (2010); Piccinelli et al. (2011); Frozza et al. (2013)
Biochanina A 	Extrato etanólico	Maceió (AL)	Antiproliferativa	Lotti et al. (2010); Piccinelli et al. (2011); Frozza et al. (2013)

Tabela 1. (Continuação)

Vestitol 	Extrato etanólico/ Fração clorofórmica	Marechal Deodoro (AL)	Antibacteriana, anticarie, anti- inflamatória e antioxidante	Oldoni et al. (2011); Piccinelli et al. (2011); Bueno-Silva et al. (2013a)
Neovestitol 	Extrato etanólico/ Extrato metanólico/ Fração clorofórmica	Marechal Deodoro (AL)	Antibacteriana, anticarie, anti- inflamatória e antioxidante	Lotti et al. (2010); Oldoni et al. (2011); Piccinelli et al. (2011); Bueno-Silva et al. (2013a)
Liquiritigenina 	Extrato etanólico	Maceió (AL)	Antioxidante	Oldoni et al., 2011; Piccinelli et al. (2011); Frozza et al. (2013)

Quanto aos efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios, têm-se estudado diferentes modelos de estudo agudo e crônico utilizando a própolis vermelha. A inibição da prostaglandina, inibição de prostanoídes (especialmente PGE₂) e citocinas pro-inflamatórias (LUSTOSA et al., 2008), redução da atividade da via do óxido nítrico (NOS), redução da adesão leucocitária (BUENO-SILVA et al., 2013b) e da atividade enzimática durante o processo de cura e inibição do TNF- α devem ser considerados como diferentes mecanismos utilizados por esta substância. Além disso, a cicatrização de feridas cutâneas com a utilização da própolis vermelha parece ser facilitada pela supressão do fator de transcrição NF κ B associado à inflamação (OLDONI et al., 2011).

No entanto, esses constituintes e sua atividade farmacológica podem variar amplamente de região para região de acordo com a flora local, época de coleta e método de extração (PARK et al., 1998; PARK et al., 2002; MASSARO et al., 2014).

O método de extração da própolis interfere diretamente no rendimento e seletividade de alguns componentes. A técnica convencional de extração utiliza etanol como solvente, enquanto outros métodos, como a extração de fluidos supercríticos, também foram descritos (MACHADO et al., 2015; MACHADO et al., 2016). A própolis obtida pela extração aquosa contém aminoácidos, matéria orgânica e carboidratos, os quais não estão presentes na extração etanólica. A extração aquosa é amplamente usada como aditivos em alimentos e cosméticos, devido a suas propriedades e por causar mínima estimulação olfatória. Por outro lado, a extração com etanol fornece facilmente compostos lipofílicos, que estão em grandes quantidades, que atrai considerável interesse por parte dos pesquisadores (INOUE et al., 2008).

É sabido que os principais agentes farmacológicos presentes na própolis são de caráter apolar, o que torna a solução hidroalcoólica um veículo extrator ideal (HAYACIBARA et al., 2005).

Park et al. (1998) avaliaram diferentes concentrações de etanol na extração de própolis e relataram que variações entre 70% e 80% não apresentaram diferença estatisticamente significativa na atividade antimicrobiana desta substância. Siqueira et al. (2009) afirmaram que o álcool 70% apresentou uma

melhor produção de compostos fenólicos, apresentando propriedades biológicas mais evidentes.

Segundo Pontes et al. (2018), tendo em vista a variabilidade de extratos de própolis existentes, a padronização sobre localização geográfica e as formas e solventes utilizados pode contribuir positivamente no controle de qualidade assegurando melhor atividade biológica.

Estudos mostram que a ação da própolis contra o crescimento microbiano por vezes apresentam resultados controversos. Uma possível explicação para este fato é que a composição química da própolis parece variar segundo a época e região onde é coletada, com alteração quantitativa e qualitativa dos seus princípios ativos (GEBARA et al., 2002). Mendonça et al. (2015) coletaram 12 amostras de própolis vermelha ao longo do ano no estado de Sergipe. Os autores realizaram a extração com etanol 70% e avaliaram a variação de cor e de constituintes químicos em função da variação climática. Foi concluído que existe variação gradual na cor e na composição química da própolis vermelha estudada, com melhores rendimentos entre os meses de Abril e Junho. Porém, segundo Sforcin et al. (2000), a própolis coletada no Brasil não mostra variação na constituição química em função da época e região da coleta.

Segundo Pinto et al. (2001), a combinação de extratos de própolis com antimicrobianos apresenta efeito sinérgico. Santos (2003) relata que nenhum dos princípios ativos testados isoladamente em seus estudos foram mais efetivos contra periodontopatógenos do que o extrato etanólico de própolis, mostrando que a atividade antimicrobiana é provavelmente causada pelo efeito sinérgico dos diferentes componentes da própolis. Badhauria e Nirala (2008) relatam que o extrato etanólico bruto da própolis reverte a lesão hepática subcrônica induzida por tetracloreto de carbono, além da toxicidade aguda induzida por acetaminofeno.

Diferentes estudos avaliando a atividade antimicrobiana de produtos naturais em diversas cepas bacterianas têm demonstrado resultados positivos dessas substâncias na inibição do crescimento ou desenvolvimento das mesmas, o que também tem sido demonstrado em Odontologia, principalmente com o advento de biofilmes multirresistentes a antibióticos (ROBERTS, 2002) e efeitos

colaterais associados ao uso da clorexidina, que é aclamada como padrão ouro no controle do biofilme dental (JONES, 1997).

2.4 Biofilme dental

Biofilmes são definidos como uma comunidade diversificada de micro-organismos encontrados na superfície dental incorporada em uma matriz extracelular polimérica de origem hospedeira e microbiana (MARSH, 2004). Micro-organismos da microbiota bucal não existem como entidades independentes, mas funcionam como uma comunidade microbiana coordenada, espacialmente organizada e metabolicamente integrada (MARSH, 2006).

Estas comunidades microbianas podem ser encontradas em quase todos os lugares associados à umidade e formar-se em uma ampla variedade de superfícies, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos residenciais, tubulações industriais ou de sistema de água potável ou sistemas aquáticos naturais. Sabe-se que existem pelo menos dez vezes mais bactérias que habitam o corpo humano do que o número de células humanas (HUANG et al., 2011).

Os biofilmes dentais são provavelmente o tipo de biofilme natural mais bem estudado em seres humanos e são considerados o fator de maior importância dentro da etiologia das doenças bucais, como cárie, gengivite e periodontite, tendo uma relação muito grande com a higiene bucal deficiente (CURY, 1997).

Bactérias do grupo *Streptococcus* estão relacionadas à colonização inicial no processo de formação do biofilme dental (MARSH, 2006). No entanto, a cavidade bucal pode ser ainda um reservatório de *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente em pacientes com periodonto comprometido, o que dificulta o tratamento e, em caso de infecções oportunistas, pode comprometer pacientes debilitados, como idosos e imunossuprimidos (SANTOS et al., 2002; BACT et al., 2006).

Estas estruturas se formam através de uma sequência ordenada de eventos, resultando em uma comunidade microbiana estruturalmente e funcionalmente organizada e rica em espécies. Os estágios na sua formação incluem: formação de película adquirida; adesão reversível envolvendo interações

físico-químicas de longo alcance e fracas entre a superfície celular e a película adquirida; co-adesão resultando na ligação de colonizadores secundários às células já anexadas; multiplicação e formação de biofilmes (incluindo a síntese de exopolissacarídeos) e, ocasionalmente, desprendimento (MARSH, 2004).

No momento em que o dente é exposto na cavidade oral, proteínas e glicoproteínas presentes na saliva adsorvem-se a sua superfície formando a película adquirida. Micro-organismos interagem com essa película aderindo-se à ela. Micro-organismos subsequentes da mesma ou de diferentes espécies aderem-se não apenas à película, mas também a outras células bacterianas já adsorvidas. Uma vez aderidas, as células bacterianas crescem e se multiplicam na superfície dental formando microcolônias. Embora a adesão seja necessária para a colonização, as proporções finais de uma espécie dentro de um biofilme de cultura mista, dependerão, em última análise, da capacidade de um organismo desenvolver-se e superar as células vizinhas (ZHANG et al., 2005; MARSH, 2006).

Estudos tem demonstrado que os primeiros colonizadores são *Streptococcus*, particularmente, *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis*. *Actinomyces* spp., *Haemophili* e *Neisseria* spp. também foram encontrados (MARSH, 2006). *S. mutans*, micro-organismos Gram-positivos, são conhecidos como os mais representativos da microbiota cariogênica, responsáveis pela iniciação do processo de cárie. Sua capacidade de converter sacarose em dextranos faz com que aparentemente tenham maior habilidade para se estabelecerem e persistirem formando um biofilme insolúvel na superfície do dente. Já os *Lactobacillus*, micro-organismos Gram-negativos, quando presentes, estão associados a sítios dentários que deveriam ser restaurados (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

O método mais valioso para o controle do biofilme dental atuando na sua prevenção e remoção é o seu controle mecânico. A eficiência do controle mecânico do biofilme depende de uma série de fatores que variam desde a interação paciente-profissional até a habilidade motora do paciente para exercê-lo de forma eficiente. Este controle deve ser encarado como um recurso dinâmico dependente de motivação e destreza manual. É uma técnica simples constituída por vários dispositivos de limpeza dos dentes, porém suas armas mais poderosas, por serem mais eficientes, são as escovas dentais e os meios de limpeza

interproximal, isto é, as escovas interproximais e os fios dentais (GEBRAN; GEBERT, 2002; GURENLIAN, 2007; SIMÕES et al., 2011).

Dessa forma, a prevenção e o controle da cárie dentária e da doença periodontal dependem, impreterivelmente, do controle do biofilme. Este controle pode envolver muitas vezes aspectos mecânicos e/ou químicos (GEBRAN; GEBERT, 2002).

Dentre os agentes químicos para remoção do biofilme cariogênico ou periodontopatogênico, destaca-se o gluconato de clorexidina, que tem sido indicado pela sua eficácia comprovada (LAWRENCE JR et al., 2008; SIMÕES et al., 2011).

2.5 Antimicrobianos em Odontologia

O controle químico do biofilme com a utilização de antimicrobianos pode ser realizado no sentido profilático ou terapêutico (CURY, 1997; MARSH, 2006). No primeiro caso, evitaria-se um desequilíbrio da microbiota, quando os métodos mecânicos são ineficientes. No sentido terapêutico diz respeito a indivíduos que já apresentam uma microbiota desequilibrada, visando atingir as bactérias predominantes relacionadas com as doenças, objetivando o reequilíbrio da microbiota e sua harmonia com o hospedeiro. Em princípio, o controle químico seria indicado como coadjuvante ao controle mecânico, podendo substituí-lo por períodos curtos de tempo, quando necessário.

Os antimicrobianos em Odontologia são representados pelos agentes catiônicos, agentes não-iônicos, compostos fenólicos, alógenos, enzimas, agentes oxigenantes, xilitol, substâncias naturais e até a combinação de agentes.

Dentre estes, os agentes catiônicos destacam-se por adsorverem-se à compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental, como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa bucal (ZANATTA; RÖSING, 2007).

A clorexidina é o principal agente antimicrobiano do grupo dos agentes catiônicos. Ela foi utilizada pela primeira vez na Odontologia em 1959. Os primeiros estudos sobre sua ação no controle da placa dental foram realizados

em 1969 e 1970 por Løe e Schiott. Trata-se de um anti-séptico catiônico utilizado em diferentes campos médicos devido ao seu amplo espectro de ação antibacteriana. Possui a propriedade de substantividade, pois permanece retida no local de ação, sendo liberada lentamente, evitando que seu efeito seja rapidamente neutralizado (ARAUJO et al., 2001). A sua estrutura química é simétrica, com dois anéis de clorofenila e dois grupos de biguanida conectados por um cadeia central de hexametileno. O composto é uma base forte disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos por proporcionar maior solubilidade à substância (SAJJAN et al., 2016) (Figura 3).

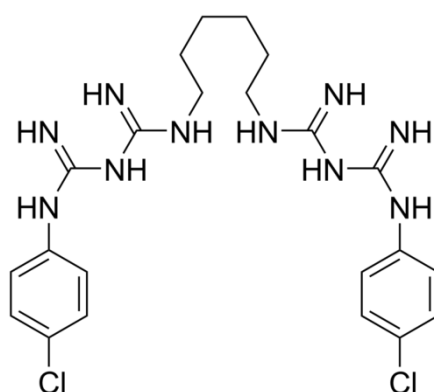


Figura 3 – Estrutura química do digluconato de Clorexidina

Por ser uma molécula catiônica, o seu mecanismo de ação antibacteriano é explicado devido à molécula da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente (JUIZ et al., 2010).

Em baixas concentrações, a clorexidina altera o equilíbrio osmótico bacteriano, com a consequente liberação de componentes citoplasmáticos que promovem sua ação bacteriostática. Em concentrações elevadas, esta molécula promove a precipitação/coagulação de proteínas citoplasmáticas. A atividade bactericida da clorexidina é particularmente eficaz contra bactérias Gram-

positivas. Após o uso de um produto à base de clorexidina de alta concentração, um efeito bactericida imediato é esperado, seguido por um efeito bacteriostático prolongado (JUIZ et al., 2010). Ela inibe a atividade metabólica da glicose pelo *S. mutans* e reduz a atividade proteolítica do *P. gingivalis* (MARRELLI et al., 2015).

No entanto, este poderoso antiséptico, em uso contínuo, produz alguns efeitos colaterais indesejáveis: inativação na presença de sulfatos e cálcio (VAN GRUNSVEN; CARDOSO, 1995; SAJJAN et al., 2016), manchamento extrínseco na película adquirida adsorvida ao esmalte dentário, hiperplasia de papilas linguais e perda do sentido da gustação, o que levou a questionamentos sobre o uso da clorexidina como antimicrobiano contra cárie (VOLLMER et al., 2010; LOBO et al., 2014; MARRELLI et al., 2015).

A atividade antibacteriana da clorexidina poderia ser melhorada por meio de sua combinação com produtos naturais, que poderiam ser usados para reduzir a sua concentração em colutórios bucais, minimizando os efeitos colaterais e maximizando a atividade antimicrobiana desta substância (JUIZ et al., 2010).

Diante dessas premissas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade in vitro e in vivo, assim como a atividade sobre bactérias de importância odontológica da própolis vermelha oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. coletada no litoral da Paraíba, Brasil.



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a toxicidade e a atividade do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha oriunda de *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Paraíba, Brasil) (EPVP) em bactérias de importância odontológica.

3.2 Específicos

- ✓ Caracterizar quimicamente o EPVP;
- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EPVP contra cepas bacterianas de importância odontológica;
- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) do EPVP em associação com a clorexidina (Clx) contra cepas bacterianas de importância odontológica;
- ✓ Determinar a atividade antibacteriana do EPVP em modelo de biofilme monoespécie e multiespécie;
- ✓ Avaliar a toxicidade do EPVP frente ao microcrustáceo *Artemia salina*;
- ✓ Avaliar o potencial hemolítico e anti-hemolítico em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O;
- ✓ Avaliar a atividade oxidante e antioxidante do EPVP sobre a hemoglobina humana;
- ✓ Investigar a atividade coagulante, vasoconstrictora e hemorrágica do EPVP sobre a membrana corioalantóide de ovo de galinha;

-
- ✓ Avaliar a atividade aneugênica e clastogênica do EPVP em eritrócitos de roedores;
 - ✓ Investigar toxicidade aguda do EPVP considerando: ocorrência de mortes, estimativa da DL_{50} , parâmetros comportamentais, consumo de água e ração, evolução ponderal, parâmetros bioquímicos, assim como análise anatomopatológica e histopatológica de órgãos vitais.



Material e Métodos

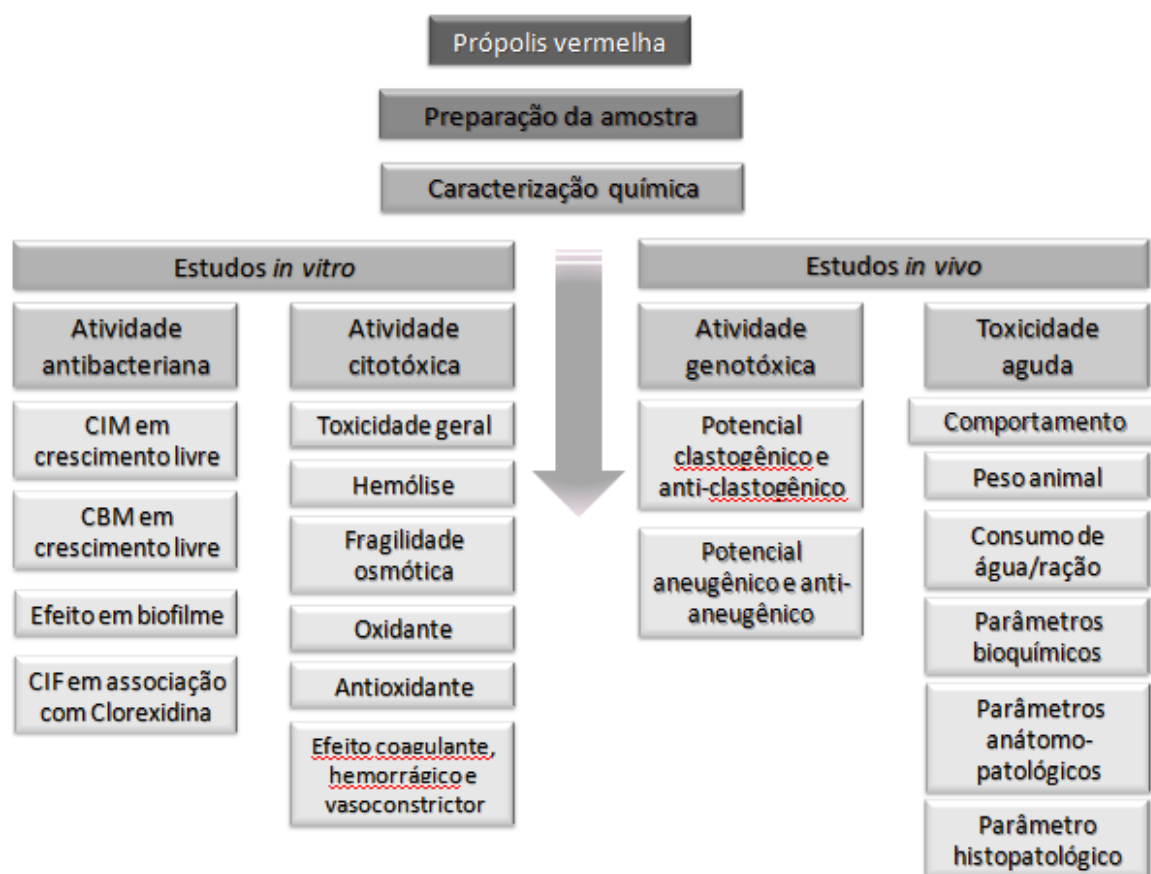
4.1 Locais de Trabalho

O ensaio de caracterização química da própolis vermelha foi realizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Estadual da Paraíba. Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antimicrobiana, bem como os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e toxicidade aguda foram realizados nos Laboratórios de Ensaio Toxicológicos (LABETOX I e II) do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Já os ensaios envolvendo atividade antibiofilme e atividade toxicológica frente ao microcrustáceo *A. salina* foram realizados no Laboratório de Biologia Bucal (LABIAL) do Departamento de Odontologia Preventiva e Social e no Laboratório de Histologia e Embriologia Odontológica do Departamento de Morfologia, CCS, UFPB.

4.2 Posicionamento Ético

Para realização deste trabalho foram levados em consideração os aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo seres humanos, bem como os aspectos éticos e legais da pesquisa envolvendo animais. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Lauro Wanderley - HULW, da Universidade Federal da Paraíba, com a Certidão CEP/HULW nº 2.285.778/17 (Anexo 1); e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba, com a Certidão CEUA/CBiotec nº 0310/13 (Anexo 2).

4.3 Delineamento experimental - fluxograma



4.4 Obtenção e preparação da substância teste

O produto bruto da propolis vermelha foi gentilmente cedido por Edivaldo Pacheco Filho, apicultor e mestrando em Ciências Agroindustriais (UFCG). Este foi coletado no litoral da Paraíba (SL -07° 06'54"e WL -34° 51'47") no mês de fevereiro do ano 2016. O extrato bruto foi mantido a - 20°C até o seu processamento.

Para preparação da amostra, 10 mg do extrato bruto foi pesado, fragmentado e solubilizado em 1 mL de etanol 70%, para os estudos *in vitro* ou 1 mL de uma solução contendo Tween-20 a 0,1% e DMSO 5% para os estudos *in vivo*.

4.5 Animais

Para a realização do ensaio de toxicidade com *Artemia salina* Leach, foram utilizados 20g de cistos do microcrustáceo (Sigma Aldrich®). Para a realização dos ensaios de citotoxicidade em membrana corioalantóide foram utilizados trinta ovos de galinha no nono dia de fertilização. Para a realização de estudos *in vivo* envolvendo genotoxicidade e toxicidade aguda da própolis vermelha, foram utilizados dezoito camundongos linhagem Swiss do Biotério Thomas George. Estes foram mantidos a uma temperatura de $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e em ciclos de claro e escuro de 12h.

4.6 Caracterização química

4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada

O extrato foi analisado por cromatografia em camada delgada para determinar os componentes majoritários presentes no extrato bruto (amostra 1) e hidroalcoólico (amostra 2) da própolis vermelha. Foram utilizadas placas de alumínio de gel de sílica F254 (Macherey-Nagel®, Alemanha) de dimensões 5 x 5 cm. As amostras foram aplicadas manualmente nas placas com uma distância de 5 mm de suas bordas e a 5 mm da origem e com término de 5 mm do final da placa (Fig 4).

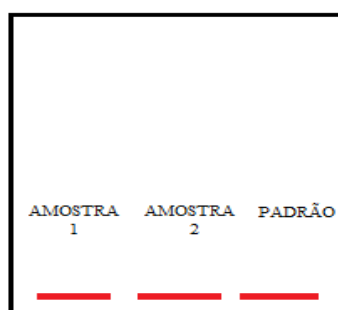


Figura 4. Esquema para demonstração de placas cromatográficas e orientação das bandas.

Os padrões de metabólitos utilizados neste sistema de eluição estão descritos na Tabela 2. Após a eluição das placas, as mesmas secaram à temperatura ambiente. Na sequência, foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito. A luz UV (254 e 365 nm) (Prodicil, Curitiba, Parana, Brasil) foi utilizada para o desenvolvimento das manchas. As bandas obtidas foram comparadas às bandas dos padrões correspondentes e em seguida as imagens foram digitalizadas.

Tabela 2. Sistemas de eluição utilizados a partir dos padrões para fornecer metabolitos

Metabólito	Sistema de eluição	Revelador	Padrão
Alcaloides	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O ¹	Dragendorff	Atropina
Açúcares redutores	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O ¹	Timol/H ₂ SO ₄ etanoico 10%	D-Fructose
Cumarinas	Éter: Tolueno: CH ₃ COOH ²	KOH 10%	Cumarina MeOH
Derivados antracênicos	AcOEt:CH ₃ COOH:H ₂ O ³	HNO ₃ / KOH 10%	Antraquinona
Derivados cinâmicos	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O ¹	NEU/ PEG 5% etanoico	Ácido caféico
Flavonoides	AcOEt:CH ₃ COOH:H ₂ O ³	NEU/PEG	Quercetina/ luteolina
Terpenos/Esteroides	Tolueno:AcOEt ⁴	Lieberman Bouchard	B-Sitosterol
Taninos hidrolisáveis	AcOEt:CH ₃ COOH:H ₂ O ³	Cloreto férico	Ácido gálico
Taninos condensados	AcOEt:HCOOH:AcOH:H ₂ O ¹	Vanilina clorídrica	Catequina

4.7 Avaliação antibacteriana do EPVP

4.7.1 Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios de avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme foram Brain Heart Infusion (BHI) e BHI Ágar adquiridos da Sigma-Aldrich[®], São Paulo, SP, Brasil. Ambos foram preparados conforme recomendações do fabricante e esterilizados em autoclave a 121 °C.

4.7.2 Cepas bacterianas

Para os ensaios de atividade antibacteriana e antibiofilme, foram utilizadas cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus mitis* ATCC 903, *Streptococcus sanguis* ATCC 15300, *Streptococcus oralis* ATCC 10557, *Streptococcus salivarius* ATCC 7073 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Todas as cepas de micro-organismos utilizados neste estudo fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Toxicologia – Labetox II, IPeFarM, Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em ágar nutriente a uma temperatura de 4 °C. Foram utilizados, para os ensaios, repiques de 24 horas em BHI, incubados a 37 °C.

4.7.3 Inóculo bacteriano

Para preparação do inóculo, culturas de bactérias foram semeadas em meio BHI e incubadas a 37 °C durante 24-48 horas. Colônias de cada cultura foram suspensas separadamente em solução de NaCl 0,85% esterilizada e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland ($1-5 \times 10^8$ UFC/mL) (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

4.7.4 Antimicrobiano licenciado

O antimicrobiano licenciado para os testes envolvendo bactérias foi digluconato de clorexidina (Clx) 0,12% adquirido da Dilecta[®] Farmácia e produtos de manipulação (João Pessoa-PB, Brasil).

4.7.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividades antibacteriana foram realizados conforme CLSI (2012), Viljoen et al. (2003) e Sahin et al. (2004).

A determinação da CIM das substâncias foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo. Foram utilizadas placas de microdiluição contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo BHI duplamente concentrado nos orifícios. Em seguida, 100 µL do produto, também duplamente concentrado, foi dispensado nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1000 µg/mL até 3,9 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa estava a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo das espécies nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa de micro-organismo.

Paralelamente, foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas e também controle de sensibilidade destas cepas frente à ação do antimicrobiano considerado padrão na utilização clínica, clorexidina (Clx) 0,12%. As concentrações de Clx variaram de 120 a 0,93 µg/mL.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 37°C por 24 - 48 horas. O crescimento bacteriano foi avaliado pela adição de 10 µL de uma solução 0,01% (10mg/100mL) de resazurina (VETEC[®]). Define-se a CIM para os produtos testados como a menor concentração capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento do micro-organismo verificado nos orifícios, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CIM's obtidas em três ensaios.

4.7.6 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após leitura da CIM, alíquotas de 20 µL do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento bacteriano nas placas de microdiluição foram semeadas em placas de BHI Ágar. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24-48 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração em que o crescimento foi inferior a 3 colônias (aproximadamente 99 a 99,5 % de atividade de morte). Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CBM's obtidas nos três ensaios (ESPINEL-INGROFF et al., 2002).

4.7.7 Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)

Diluições do EPVP e da Clx foram realizadas para avaliar as interações contra as cepas de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguis* e *P. aeruginosa*. Foi utilizada a técnica descrita por Schelz et al. (2006), onde utilizou-se placas de microdiluição contendo 96 cavidades, com fundo em forma de “U” contendo concentrações do EPVP variando de 1000 a 3,9 µg/mL e Clx variando de 120 a 0,93 µg/mL. Foi utilizada uma placa para cada linhagem. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h e após esse período foi avaliado o crescimento bacteriano pela adição de 10 µL de uma solução 0,01% (10mg/100mL) de resazurina (VETEC®).

A interação destas substâncias, *in vitro*, foi quantificada pela determinação da concentração inibitória fracionada (CIF) (ELIOPOULOS E MOELLERING, 1996). O índice CIF foi calculado da utilizando-se a fórmula:

$CIF = \frac{\text{CIM da droga A em combinação}}{\text{CIM da droga A sozinha}} + \frac{\text{CIM da droga B em combinação}}{\text{CIM da droga B sozinha}}$

Os índices CIF foram interpretados da seguinte forma: ≤ 0,5: sinergismo; > 0,5-1: efeito aditivo; > 1 – 4: indiferença; > 4: antagonismo.

4.7.8 Determinação da atividade antibiofilme

Neste estudo foram utilizados 30 incisivos bovinos, padronizados de acordo com as dimensões de sua coroa (comprimento inciso-cervical: 20 ± 2 mm e largura méso-distal: 10 ± 2 mm), armazenados em formol a 10% (pH 7,0), em temperatura ambiente, até o seu uso. Os dentes coletados foram limpos através de raspagem com curetas periodontais e profilaxia mecânica para remoção dos restos dos tecidos aderidos à sua superfície. Posteriormente, os mesmos foram examinados com o auxílio de uma lupa de 5x de aumento para averiguação de possíveis trincas, rachaduras, cáries e alterações do esmalte, situação na qual foram excluídos da amostra.

Um total de 40 blocos de esmalte (5x5x3mm) foram preparados utilizando-se um disco diamantado dupla face, em cortadeira de precisão (Labcut 1010), sob irrigação constante. Os espécimes foram planificados em politriz metalográfica (PSK-2V, Skill-tec Comércio e Manutenção Ltda, São Paulo, SP, Brazil), utilizando-se lixas de silicone de granulações variadas (600 – 1500), sob irrigação constante. O polimento da superfície do esmalte foi realizada com feltros umedecidos e suspensão de diamante de 1 μ m.

Em seguida, os blocos de dentes foram dispensados em placas para cultura de células de 24 poços contendo 1,6 mL de BHI e 0,4 mL do inóculo bacteriano de *S. mutans*, *S. mitis* e *S. oralis* e multispecies (*S. mutans* + *S. mitis* + *S. oralis*) padronizados ao valor 0,5 da escala de McFarland. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 horas. Após este período, cada bloco foi mergulhado em 1 mL de solução salina a 0,9% para remoção das bactérias não aderidas ao biofilme e dispensados em outro poço contendo 1 mL de EPVP durante 60 segundos. Em seguida os blocos contendo biofilme foram dispensados em 2 mL de NaCl 0,9% e agitados. Após o período de 5 minutos, foram preparadas diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Em seguida, 10 μ L de cada diluição foi plaqueada em BHI Ágar suplementado com 15% de sacarose. As concentrações de EPVP variaram de 250 a 75 μ g/mL. Foi realizado todo o procedimento também para Clx 0,12% (15 μ g/mL), utilizada como controle positivo. Culturas bacterianas com crescimento livre foram utilizadas como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 h. Após esse

período, o número de UFC/mL foi determinado. As análises foram realizadas em triplicata em três dias distintos.

4.8 Avaliação da toxicidade do EPVP

4.8.1 Determinação da toxicidade em *Artemia salina* Leach

Os cistos de *A. salina* foram colocados para eclodir em um recipiente contendo água salgada 30g/L (pH 8,5), iluminação (lâmpada de 40 W), a 24 °C por 48 h para originar os metanúplios (MEYER et al. 1982; MCLAUGHLIN et al. 1998).

Os metanúplios (10) foram colocados em placas para cultura de células de 24 poços contendo 2 mL de NaCl 0,9% e própolis vermelha nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL e incubados sob iluminação por 24h. Um grupo controle foi preparado contendo apenas os metanúplios em NaCl 0,9%. Decorrido este tempo, foi realizada a contagem do número de metanúplios vivos e mortos e expressa em percentagem, calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ Mortalidade} = \frac{\text{Número de indivíduos mortos}}{\text{Número total de indivíduos}} \times 100$$

O grau de toxicidade apresentado por extratos naturais sobre larvas de *Artemia salina* Leach é representado pela dose letal média (DL₅₀): valores de DL₅₀ acima de 1000 µg/mL são considerados atóxicos; baixa toxicidade quando a DL₅₀ for superior a 500µg/mL; moderada toxicidade para DL₅₀ entre 100 a 500µg/mL e muito tóxico quando a DL₅₀ for inferior a 100 µg/mL (AMARANTE, 2011; NGUTA, 2011).

4.8.2 Avaliação da citotoxicidade do EPVP

4.8.2.1 Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos (tipos A, B e O) foram oriundos de bolsas de sangue que não poderiam mais ser utilizadas para este fim. As bolsas foram obtidas na Unidade Transfusional do Hospital Universitário Lauro Wanderley /UFPB. A manipulação e o descarte das bolsas e dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Biosegurança seguidas pela referida unidade.

4.8.2.2 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

Uma amostra de sangue humano foi misturado com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e os eritrócitos foram ressuspensos em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. As amostras do EPVP em diferentes concentrações foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100% de hemólise). Em seguida as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 °C sob agitação lenta e constante (100 rpm). Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (RANGEL et al.,1997).

A atividade hemolítica foi expressa em percentagem de hemólise (PHANSRI et al., 2011), que foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{CN}}}{A_{\text{máx}} - A_{\text{CN}}} \times 100$$

Onde:

- $A_{amostra}$ é Absorbância à 540 nm dos eritrócitos humanos com o EPVP.
- A_{CN} é Absorbância à 540 nm dos eritrócitos humanos na ausência do EPVP, controle negativo.
- $A_{máx}$ é Absorbância à 540 nm dos eritrócitos humanos com Triton X-100 (1%), controle positivo.

Os experimentos foram realizados em triplicata e o resultado expresso em percentual de hemólise em comparação aos grupos controle.

4.8.2.3 Determinação da atividade anti-hemolítica em eritrócitos humanos

A avaliação da atividade anti-hemolítica sobre eritrócitos humanos foi realizada com uma suspensão de eritrócitos a 0,5%. Uma solução do produto teste em diferentes concentrações foi incubada em tubos contendo 2 mL de uma suspensão de eritrócitos por 1h a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Decorrido este tempo, as preparações foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Os eritrócitos foram então ressuspensos em uma solução hipotônica de cloreto de sódio (0,24 %) e agitadas a 100 rpm por 90 minutos a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e a hemólise foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (DACIE, 2001).

Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0% de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos apenas com a presença da solução de cloreto de sódio, como controle positivo (100% de hemólise). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.2.4 Determinação da atividade oxidante e antioxidante em hemoglobina humana

Para investigar o potencial oxidante do produto teste foi preparada uma suspensão de eritrócitos a 30% em PBS (11,35g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 24,36g Na_2HPO_4 e 7,18g NaCl para 1 L; pH 7,4), suplementado com glicose (200

mg/dL), pH 7,6. Em seguida, as amostras do produto teste em diferentes concentrações foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos e incubados por um período de 1 hora sob agitação lenta e constante (100 rpm) a 22 ± 2 °C. Em continuidade, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a percentagem de metahemoglobina (metHb) em relação a hemoglobina (Hb) total foi quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 630 nm e 540 nm, respectivamente. A percentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina (PH), um comprovado agente oxidante (WEFFORT-SANTOS et al., 2008).

Para investigar o potencial antioxidante, após o período de incubação de 1h referente à etapa descrita anteriormente, foi adicionado um 1 mmol/L do agente oxidante fenilhidrazina. As suspensões foram aeradas e mantidas sob agitação lenta e constante (100 rpm) por mais 20 minutos a 22 ± 2 °C. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, diluídas em tampão fosfato (9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 5,7g KH_2PO_4 para 1 L) e a percentagem de metHb em relação a Hb total foi quantificada por espectrofotometria a 630 nm e 540 nm. A percentagem de metHb formada foi comparada com os valores obtidos para a fenilhidrazina (PH), um comprovado agente oxidante (WEFFORT-SANTOS et al., 2008). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.8.3 Determinação da atividade coagulante, vasoconstrictora e hemorrágica em membrana corioalantóide de ovo de galinha

Os ovos de galinha passaram por inspeção visual e os que apresentaram lesão na casca foram descartados. Foram selecionados ovos pesando entre 50 e 60 g, identificados e incubados por nove dias em incubadora à temperatura de $37 \pm 0,5$ °C.

No nono dia de incubação, foram selecionados 5 ovos para cada grupo controle e teste. Sobre um suporte e em posição vertical com a câmara de ar voltada para cima, cada ovo teve sua casca retirada, expondo a membrana da casca. Esta membrana foi umidificada com NaCl 0,9% à 37 °C e removida expondo a membrana corioalantoide. A membrana corioalantoide passou por

observação visual e qualquer tipo de alteração implicou no descarte do ovo. Em seguida, foram aplicados sobre a membrana 300 µL do EPVP (75, 125 e 250 µg/mL). Após 20 segundos de contato, a amostra foi removida com 5 mL de solução salina isotônica à 37 °C. O grupo controle recebeu apenas DMSO 5%. Durante 5 minutos, a membrana corioalantoide foi examinada e as reações fisiológicas (vasoconstrição, hemorragia e coagulação) observadas foram registradas em função de seu tempo de aparecimento (STEILING et al., 1999).

Os tempos (em segundos) em que cada processo começou foram aplicados na equação:

$$IS = \frac{(301 - \text{Hemorragia}) \times 5 + (301 - \text{Vasoconstrição}) \times 7 + (301 - \text{Coagulação}) \times 9}{300}$$

O índice de irritação (IS) pode ser avaliado da seguinte forma: 0 - 0,9: sem irritação; 1,0 - 4,9: ligeira irritação; 5,0 - 8,9: irritação moderada e 9,0 - 21,0: irritação severa (VARGAS et al., 2007).

4.8.4 Avaliação da genotoxicidade do EPVP

4.8.4.1 Determinação da atividade clastogênica e aneugênica em eritrócitos de camundongos

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia para a condução de estudos não - clínicos de toxicologia e segurança farmacológicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos (BRASIL, 2013) e na OECD 474 (1997), com modificações.

Grupos contendo três animais machos e três animais fêmeas receberam, por via oral, dose de 2000 mg/Kg da solução do produto teste. Um grupo controle (negativo) recebeu apenas o diluente da amostra e o outro grupo controle (positivo) recebeu o agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50 mg por quilo de peso do animal. Vinte e quatro horas após a administração, os animais

de todos os grupos foram anestesiados e uma amostra de sangue caudal foi colhida para o preparo de lâminas.

Após esta etapa, os animais do grupo controle foram eutanasiados com quetamina (240 mg/Kg) e xilasina (30 mg/Kg). Em seguida, os animais do grupo teste receberam o agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50 mg/Kg para verificar o potencial anti-mutagênico. Vinte e quatro horas após a administração do agente mutagênico, os animais foram anestesiados e uma amostra de sangue caudal foi colhida para o preparo de lâminas.

Posteriormente, os animais do grupo teste foram eutanasiados como descrito anteriormente. Foi utilizado o corante panótico para coloração das lâminas e estas foram analisadas para observação da presença de micronúcleos nos eritrócitos dos animais utilizando microscópio óptico no aumento de 1000X. Foram contados cerca de 2000 eritrócitos por animal (HAYASHI et al.,1994). Os resultados foram expressos como a média mais ou menos erro padrão da média.

4.8.5 Avaliação da toxicidade aguda do EPVP

O ensaio de toxicidade aguda foi baseado no guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos (BRASIL, 2013) e na OECD 423 (2001), bem como metodologias adotadas no LABETOX.

Os animais foram distribuídos em gaiolas a partir do peso aproximado e separados em grupos controle e teste. No grupo controle foi administrado o diluente (Tween-20 a 0,1% e DMSO 5%) e o grupo teste tratado com EPVP recebeu a dose de 2000 mg/Kg. Todas as doses foram administradas pela via oral. Foram utilizados 3 camundongos Swiss fêmeas por grupo.

Com o objetivo de mapear possíveis alterações comportamentais sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), após administração do produto teste, foi realizada observação cuidadosa para detectar sinais tóxicos de caráter geral nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 2 e 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental elaborado pelo Laboratório de Psicofarmacologia IpeFarM/CCS/UFPB e descrito por Almeida et al. (1999).

Desde a 24^a hora e até 14 dias após a administração da dose, foram observadas a variação do peso e o consumo de água e ração pelos animais experimentais.

No dia seguinte ao 14^o dia após a administração da dose, após jejum de 6 horas, os animais foram anestesiados com tiopental sódico, 50 mg/kg (Thiopentax[®], Cristália) e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca com o auxílio de uma agulha heparinizada. Para a análise dos parâmetros bioquímicos, o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma.

Os parâmetros bioquímicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cheu Well[®] (Roche Diagnostic System).

Após a coleta do sangue para análises bioquímicas, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os órgãos (baço, fígado, rins, coração, pulmão e estômago) retirados, pesados e examinados macroscopicamente para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações. O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula:

$$\text{Índice} = \frac{\text{peso do órgão (mg)}}{\text{peso do animal (g)}}$$

Em seguida os órgãos (fígado e rins) foram fixados em formol (10%) e seguiram para sequência de processamento histopatológico: desidratação com séries crescentes de álcool (70 a 100 %), diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina, segundo os métodos habituais. Os fragmentos tissulares foram seccionados com espessura de 3,0 µm e montados em lâminas, corados com hematoxilina-eosina e avaliados ao microscópio óptico no aumento de 400 e 1000X.

4.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos tiveram seus valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.) e analisados empregando-se o teste t (Student) não pareado para análise de duas colunas. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para a análise dos dados, utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prisma[®] versão 6.0.



Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química

5.1.1 Cromatografia em camada delgada

A Cromatografia em camada delgada do extrato bruto e do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha da Paraíba (EPVP) indicou alta prevalência de flavonóides, identificados como rutina e luteolina (Quadro 1). Após observação sob luz UV 365 nm, foi possível verificar bandas de coloração alaranjada, características desta classe de metabólitos (Figura 5). Estudos anteriores corroboram esse achado (ALENCAR et al, 2007; RIGHI et al, 2011; BUENO-SILVA et al., 2013a; FREIRES et al., 2016; REGUEIRA NETO et al., 2017).

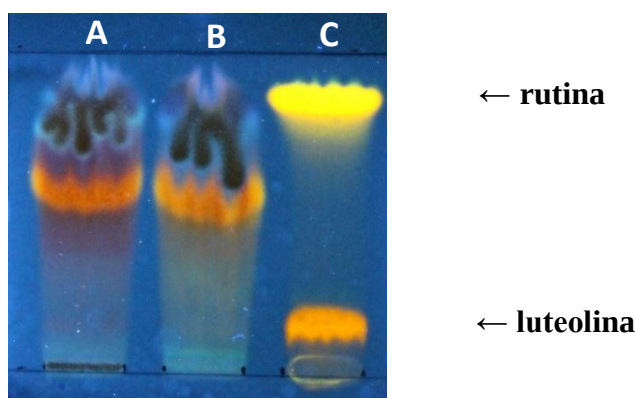


Figura 5. Bandas de coloração alaranjada, características da classe dos flavonóides presentes na própolis vermelha da Paraíba. Extrato bruto (A), extrato hidroalcoólico (B) e padrão (C).

Estes compostos bioativos são conhecidos por apresentarem várias atividades biológicas, a saber: neuroprotetoras, anti-tumoral, antimicrobianas e anti-leishmania. Os compostos: ácido p-cumárico, rutina, quercetina, luteolina e ácido cefeíco haviam sido reportados anteriormente apenas na própolis vermelha de Alagoas, Brasil (DAUGSCH et al., 2007; SILVA et al., 2008; CABRAL et al., 2009; MENDONÇA et al. 2015; FREIRES et al., 2016).

Bueno-Silva et al. (2013a/b) ressaltam em seu estudo o vestitol e neovestitol, isoflavonóides que demonstraram atividade antibacteriana frente ao

S. mutans, *S. sobrinus*, *S. aureus* e *Actinomyces naeslundii*, além de atividade anti-inflamatória.

Sabe-se que alguns fatores desempenham papéis importantes na composição da própolis: sazonalidade, luz, altitude, flora e tipo de coleta. Regueira Neto (2017) fizeram estudo da variação da concentração de compostos na própolis vermelha de acordo com a sazonalidade. Os autores avaliaram que a concentração do ácido clorogênico, ácido cafeico e ácido elágico é duas vezes maior no período seco e a concentração de luteolina e apigenina aumenta no período chuvoso. Os autores acreditam que isso deve-se à influência da sazonalidade na produção de metabólitos secundários na resina da *D. ecastophyllum*, fonte da própolis vermelha.

Quadro 1. Classe de metabólitos e padrão utilizado para apresentar os compostos bioativos

Classe de Metabólito	Padrão	Resultado
Taninos Hidrolisáveis	Ác. gálico	-
Taninos Condensados	Catequina	-
Flavonoides	Quercetina e Rutina	+
Derivados Cinâmicos	Ác. Cafeico	-
Terpenos e Esteroides	β -Sitosterol	-
Cumarinas	Cumarina	-
Açúcares redutores	D-frutose	+
Alcaloides	Nitrato de Pilocarpina	-
Antraquinonas	Senosídeo A	-

5.2 Avaliação antibacteriana do EPVP

5.2.1 Determinação das Concentrações Inibitória Mínima e Bactericida Mínima

A atividade antibacteriana do EPVP apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 125 µg/mL contra *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. salivarius* e de 62,5 µg/mL contra *S. oralis*, *S. mitis* e *P. aeruginosa*. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) desta substância variou entre 250 µg/mL contra cepas de *S. oralis* e *P. aeruginosa* e 500 µg/mL contra cepas de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *S. sanguis*. A clorexidina (Clx) exibiu CIM com valores de 15 µg/mL contra *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. sanguis* e de 60 µg/mL contra *P. aeruginosa* e CBM de 60 µg/mL contra *S. mutans*, *S. mitis* e *S. oralis* e de 120 µg/mL contra *S. salivarius* e *S. sanguis* e *P. aeruginosa* (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha da Paraíba (EPVP) e da clorexidina (clx) em diferentes espécies bacterianas.

Linhagem	CIM		CBM	
	EPVP (µg/mL)	CLX (µg/mL)	EPVP (µg/mL)	CLX (µg/mL)
<i>S. mutans</i>	125,0	15	500	60
<i>S. mitis</i>	62,5	15	500	60
<i>S. oralis</i>	62,5	15	250	60
<i>S. salivarius</i>	125,0	15	500	120
<i>S. sanguis</i>	125,0	15	500	120
<i>P. aeruginosa</i>	62,5	60	250	120

Estudos descritos na literatura têm demonstrado a associação de compostos fenólicos da própolis vermelha brasileira com sua atividade

antibacteriana (CABRAL et al., 2009; FREIRES et al., 2016). Amostras de própolis vermelha do estado de Alagoas analisadas por Bueno-Silva et al. (2013) apresentaram valores de CIM variando de $< 6,25 \mu\text{g/mL}$ contra *S. sobrinus* a 100-200 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. mutans* e *S. aureus* e a CBM variou de 250-500 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. mutans* e *A. naeslundii* a 200-400 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus*.

Oldoni et al. (2011) apresentaram valores de CIM variando de 62,5-125 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. mutans* e CBM variou de 250-500 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. mutans* em seus estudos com extrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas. Com a mesma própolis, Alencar et al. (2007) conduziram um estudo e seu extrato etanólico apresentou CIM e CBM de 50-100 $\mu\text{g/mL}$ e 200-400 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contra *S. mutans*. Os autores atribuem uma alta atividade antimicrobiana da própolis vermelha à alta concentração de compostos fenólicos. No estudo de Righi et al. (2011) e Piccinelli et al. (2011), o extrato de própolis vermelha de Alagoas também apresentou forte atividade antibacteriana contra *S. mutans*, *S. aureus*, *S. sobrinus* e *A. naeslundii*. Castro et al. (2009) apresentaram, em seu estudo, CIM entre 50-100 $\mu\text{g/mL}$ e CBM $> 1600 \mu\text{g/mL}$ para extrato etanólico da própolis vermelha da Bahia contra cepas de *S. mutans*.

Righi et al. (2011) apresentaram valores de CIM contra cepas de *P. aeruginosa* de 256 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 512 $\mu\text{g/mL}$ em estudo conduzido com a própolis vermelha de Alagoas. Resultados semelhantes contra *P. aeruginosa* foram descritos por Regueira Neto et al. (2017) em estudo com própolis vermelha de Pernambuco.

Em um estudo comparativo entre quatro tipos de própolis brasileiras: amarela, verde, marrom e vermelha, Machado et al. (2016) relataram que esta última possui a menor CIM e CBM (6,3 $\mu\text{g/mL}$ e 12,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) contra *P. aeruginosa*.

Feres et al. (2005) avaliaram o efeito de própolis verde em amostras de saliva de 25 pacientes com doença periodontal e 25 pacientes saudáveis. O mecanismo de ação da própolis, segundo os autores, seria uma bacteriólise parcial devido à ruptura da parede celular e desorganização da membrana plasmática bacteriana, bem como inibição de síntese protéica. Segundo os pesquisadores, a própolis apresentou propriedade antimicrobiana significativa frente a periodontopatógenos, sugerindo que esta substância poderia ser usada

terapeuticamente no controle do crescimento da microbiota oral. Segundo Gebara et al. (2002), a própolis também mostrou atividade antimicrobiana em cepas de *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, micro-organismos envolvidos no desenvolvimento da periodontite.

Em um estudo com extratos naturais, Kuete (2009) mostrou que um extrato tem significativa eficácia antibacteriana se a CIM é menor ou igual a 100 µg/mL, moderada eficácia se a CIM estiver entre 100 e 625 µg/mL e baixa eficácia se a CIM estiver acima de 625 µg/mL. Baseado nisso, podemos afirmar que o extrato hidroalcoólico de própolis utilizado neste estudo tem atividade antibacteriana significativa contra *S. mitis*, *S. oralis* e *P. aeruginosa* e moderada atividade antibacteriana contra *S. mutans*, *S. salivarius* e *S. sanguis*.

5.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Fracionada

Os resultados desse estudo demonstraram que a combinação entre EPVP e clorexidina apresenta sinergismo para as linhagens de *S. mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius* (CIF < 0,5) e efeito aditivo para linhagens *S. mitis*, *S. sanguis* e *P. aeruginosa* (CIF > 0,5 – 1) (Tabela 4).

Estes resultados demonstram que a associação conseguiu diminuir a CIM de ambos os produtos em até dezesseis vezes, o que demonstra que os produtos conseguem potencializar sua ação quando administrados em conjunto.

Tais descobertas sustentam os resultados encontrados por outros autores sobre a atividade antimicrobiana sinérgica da própolis. Pippi et al. (2015) realizaram um estudo associando a própolis vermelha de Alagoas ao Fluconazol demonstrando efeito sinérgico contra *Candida* spp. Regueira-Neto et al. (2017) realizaram estudo associando a própolis vermelha de Pernambuco à Gentamicina e Imipenem contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* e relataram efeito sinérgico da própolis associada à Gentamicina. Os autores encontraram sinergismo na associação com Imipenem apenas contra *P. aeruginosa*.

Tabela 4. Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e tipo de interação do extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha da Paraíba (EPVP) em associação à clorexidina (CLX) em diferentes espécies bacterianas.

Linhagem	CIM EPVP (µg/mL)	CIM CLX (µg/mL)	EPVP / CLX (µg/mL)	Índice CIF	Tipo de Interação
<i>S. mutans</i>	125,0	15,0	7,81 / 3,75	0,31	Sinergismo
<i>S. mitis</i>	62,5	15,0	7,81 / 3,75	0,62	Aditiva
<i>S. oralis</i>	62,5	15,0	7,81 / 3,75	0,37	Sinergismo
<i>S. salivarius</i>	125,0	15,0	7,81 / 3,75	0,31	Sinergismo
<i>S. sanguis</i>	125,0	15,0	7,81 / 7,5	0,56	Aditiva
<i>P. aeruginosa</i>	62,5	60,0	31,25 / 3,75	0,56	Aditiva

Outros tipos de própolis também demonstraram efeito sinérgico contra micro-organismos. Orsi et al. (2012) realizaram um estudo associando própolis brasileira e búlgara à três tipos de antibióticos: neomicina, tetraciclina e cloranfenicol contra *Salmonella typhi*. Os autores revelaram sinergismo entre a própolis búlgara e os antibióticos descritos. Wojtyczka et al. (2013) testaram a associação do extrato etanólico de própolis polonesa com dez drogas antimicrobianas contra *S. aureus* isolados clinicamente, sendo revelado sinergismo contra oito das dez drogas testadas.

Em um estudo realizado para verificação de efeito antimicrobiano contra *S. mutans* e *S. sanguis*, utilizaram-se três extratos de própolis brasileira: a verde, a vermelha e a marrom, de forma isolada ou em associação de extratos. Percebeu-se que todas apresentavam atividade frente aos micro-organismos testados, mas que a vermelha foi mais potente de forma isolada e também quando associada com a verde (SILVA et al., 2013).

Vários mecanismos podem estar envolvidos no modo de ação da própolis contra micro-organismos. Segundo Orsi et al. (2012), o dano à membrana ou

parede celular bacteriana é o mecanismo promovido pela própolis que facilita a entrada do antibiótico na célula dando início à sua atividade. Xie et al. (2015) e Freires et al. (2016) também acreditavam que o mecanismo de ação desta substância está relacionado aos danos à membrana plasmática, reduzindo sua fluidez e inibindo o bom funcionamento e suprimento energético da célula à medida que impede as trocas de nutrientes e metabólitos. No entanto, Eumkeb e Chukrathok (2013) estudaram os mecanismos pelos quais os derivados da própolis vermelha associados a alguns antibióticos promoviam sinergismo. Os autores relataram que este resultado pode estar relacionado à inibição da síntese de peptideoglicanos e à inibição da atividade da enzima β -lactamase.

Reporta-se o primeiro estudo envolvendo efeito sinérgico entre própolis vermelha da Paraíba (Brasil) e clorexidina contra bactérias formadoras de biofilme oral, especialmente do grupo *Streptococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*, causadora de infecções oportunistas em pacientes imunologicamente debilitados. Como foi mencionado, vários podem ser os fatores que proporcionam o sinergismo entre essas substâncias. Sabe-se que em baixas concentrações, a clorexidina altera o equilíbrio osmótico bacteriano, com a consequente liberação de componentes citoplasmáticos e em concentrações elevadas, esta molécula promove a precipitação/coagulação de proteínas citoplasmáticas bacterianas (LIM; KAM, 2008). Foi observado o efeito sinérgico/aditivo com uma concentração de Clx muito inferior à CIM, o que pode ser explicado por um possível dano à membrana ou parede celular bacteriana pelo EPVP, proporcionando a entrada da Clx, favorecendo a coagulação protéica. No entanto, estudos envolvendo a via de transdução de sinal dessas substâncias se fazem necessários para comprovação dessa hipótese.

5.2.3 Determinação da atividade antibiofilme

Segundo Reilly et al. (2014), a pesquisa precisa ser complementada com modelos de biofilme *in vitro* que examinem ainda mais as cepas clínicas em um modelo bacteriano multiespécie. Segundo os autores, para avaliar terapias alternativas, é necessário entender se esses componentes afetam a bactéria no modelo de biofilme antes de sugerir novos compostos.

Os resultados do presente trabalho demonstraram potente atividade antibiofilme do EPVP, que apresentou atividade antibacteriana contra biofilme de espécies de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis* e biofilme multiespécie. Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre a atividade do EPVP (75, 125 e 250 µg/mL) em biofilme monoespécie de *S. mitis*, *S. oralis* e multiespécie comparados com clorexidina (15 µg/mL) ($p < 0,05$) e entre esta última e a atividade do EPVP (250 µg/mL) em biofilme monoespécie de *S. mutans*. Foi verificado ainda que o potencial de atividade antibacteriana do EPVP aumentou com o aumento da concentração (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade antibacteriana do EPVP contra biofilme monoespécie de *S. mutans*, *S. mitis*, *S. oralis* e multiespécie expressa em termos de percentagem da sobrevivência em relação à clorexidina (CLX) (* $p < 0,05$).

Tratamento Espécies	EPVP (75 µg/mL)	EPVP (125 µg/mL)	EPVP (250 µg/mL)	CLX (15 µg/mL)
<i>S. mutans</i>	8,27	0,13	0,01*	0,12
<i>S. mitis</i>	0,34*	1,35*	0,34*	6,76
<i>S. oralis</i>	0,06*	0,01*	0,00*	10,56
Multispecies (<i>S. mutans</i> + <i>S. mitis</i> + <i>S. oralis</i>)	6,77*	0,12*	0,11*	8,39

Bueno-Silva et al. (2013a) avaliaram a capacidade do Neovestitol, isolado da própolis vermelha do estado de Alagoas, influenciar a formação do biofilme de *S. mutans*. Os autores concluíram que esta substância possui a capacidade de gerar um stress no metabolismo dos micro-organismos e inibir entre 45% e 60% a

atividade das glicosiltransferases, diminuindo a expressão do biofilme na superfície dental.

Duarte et al. (2006) realizaram estudo com ratos para avaliar a atividade antibiofilme do extrato de própolis marrom. Os biofilmes dentais foram induzidos pela infecção de *S. mutans* e *S. sobrinus* associado à dieta cariogênica. Os autores concluíram que o extrato não apresentou redução significativa da carga microbiana, mas verificou-se que houve diminuição na incidência de cárie superficial, bem como um decréscimo na produção de ácido no biofilme, que foi atribuído à inibição enzimática da F-ATPase citosólica. O estudo sugere que o extrato de própolis demonstra um potencial cariostático.

5.3 Avaliação da toxicidade do EPVP

5.3.1 Determinação da toxicidade em *Artemia salina* Leach

No presente estudo, foi verificado que a própolis vermelha em concentrações até 500 µg/mL não induziu a morte em *A. salina* (Figura 6). Foi verificada a morte de 100% dos microcrustáceos na concentração de 1000 µg/mL e nenhuma morte (0%) nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL. Estima-se que a DL₅₀ do EPVP para este microcrustáceo esteja em torno de 750 µg/mL, sendo considerado ativo ou detentor de compostos bioativos (DL₅₀ < 1000 µg/mL) (AMARANTE, 2011; NGUTA, 2011).

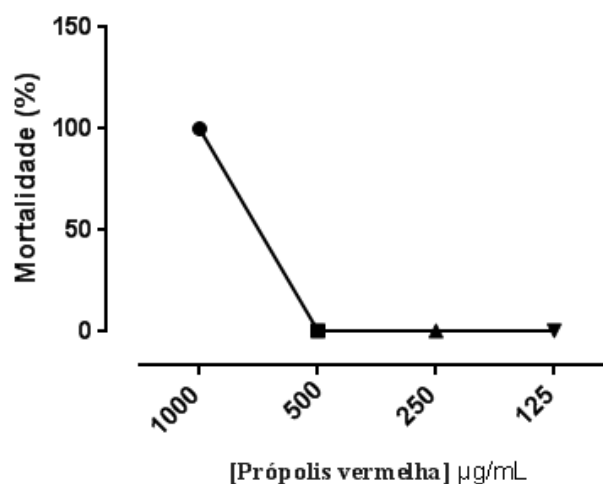


Figura 6. Mortalidade dos náuplios de *Artemia salina* expressa em termos de porcentagem em relação à concentração de extrato de própolis vermelha da Paraíba

Almeida et al. (2017) avaliaram a toxicidade de própolis verde do Amazonas em um estudo com *Artemia franciscana*. Os autores relataram alta toxicidade do extrato alcoólico desta própolis na concentração 8%. Santos et al. (2017) realizaram um estudo avaliando toxicidade da própolis produzida na Bahia utilizando *Artemia salina*. Os autores relataram uma baixa toxicidade ($DL_{50} > 10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato hexânico desta substância. Nunes et al. (2009) realizaram um teste de toxicidade em *Artemia salina* com extrato de própolis vermelha. O produto apresentou DL_{50} igual a 18,9 $\mu\text{g/mL}$, com um intervalo de confiança de 95% entre 14,6-24,8 $\mu\text{g/mL}$, o que demonstra um resultado de amostra potencialmente tóxica. Bankova (2005) realizou um estudo comparativo da toxicidade em *Artemia salina* de três tipos de própolis de diferentes regiões geográficas: Brasil, Europa e América Central. O autor concluiu que ambos possuem o mesmo padrão de citotoxicidade, não havendo correlação significativa entre esse dado e a região geográfica.

Schneider et al. (2015) também avaliaram a toxicidade de flavonóides (rutina e ácido ferúlico) utilizando *Artemia salina*. Segundo os autores, a relação entre larvas mortas (sem mobilidade) e larvas vivas (alta mobilidade) em comparação com o controle (solução salina, sem nenhuma substância aplicada), é utilizada para estimar a toxicidade das soluções testadas. No teste realizado, não houve diferença estatística entre o grupo controle (2,08 % de mortalidade) e os extratos aquosos obtidos (10,3%). Moreira et al. (2003) também estudaram a toxicidade do flavonóide quercetina em bioensaio com *A. salina*. Os autores relataram ausência de toxicidade nesse estudo.

5.3.2 Avaliação da citotoxicidade do EPVP

5.3.2.1 Determinação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos

A membrana dos eritrócitos possui moléculas que atuam como determinantes de antígenos da tipagem do sangue. As diferenças estruturais entre tipos de sangue são altamente complexas, uma vez que são considerados mais de 200 antígenos. O sistema ABO é o mais conhecido entre os 19

caracterizados e o mais importante em medicina de transfusão. Neste sistema, o parâmetro é usado para a classificação de porção antigênica consistindo em monossacarídeos presentes na superfície da membrana de eritrócitos, assim: o sorotipo A apresenta o antígeno N-acetilgalactosamina; o sorotipo B, a D-galactose; o sorotipo AB tem ambos os antígenos e o sorotipo O não possui nenhum desses antígenos (VAN GINKEL; SEVANI, 1994).

O teste de hemólise é recomendado pela Organização Mundial da Saúde no controle de qualidade de produtos naturais e também é encontrado como parte dos testes toxicológicos recomendados no Guia de Avaliação de Segurança de Cosméticos (RANGEL et al., 1997). Este teste é comumente usado para estudar citotoxicidade em células eucarióticas, pois é de baixo custo, dinâmico, fácil de aplicar, fornece informações sobre o efeito do extrato na membrana celular e requer reagentes e equipamentos de rotina (DACIE; LEWIS, 2001).

Foi verificada a CIM do EPVP em bactérias responsáveis pela formação de biofilme bucal em torno de 100 µg/mL. Analisando os resultados da citotoxicidade nesta concentração, o EPVP apresentou baixa toxicidade contra eritrócitos de tipo A (média de hemólise: 10%), de tipo B (média de hemólise: 15,5%) e de tipo O (média de hemólise: 6,14%) quando comparado ao controle positivo (Triton X-100) (Figura 7). Mesmo em alta concentração (500 µg/mL), o EPVP não tem a capacidade de causar danos à membrana plasmática de eritrócitos.

De acordo com Rangel et al. (1997), a substância apresenta um baixo potencial hemolítico quando o percentual de hemólise está entre 0 e 40%, de 40 a 80%, esse potencial é moderado e superior a 80% da hemólise, a substância é considerada com um alto potencial hemolítico. Baseado nisso, o extrato de própolis vermelha utilizado nesse estudo apresenta baixo potencial hemolítico.

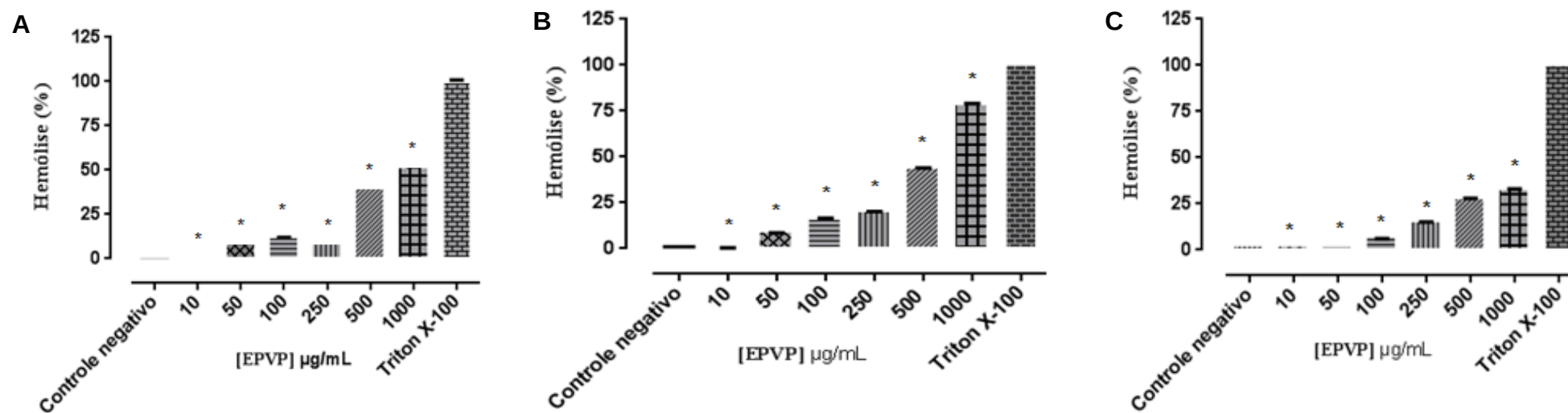


Figura 7. Hemólise em eritrócitos dos tipos sanguíneos A, B e O, (A, B e C, respectivamente), induzida pelo EPVP (* $p < 0,05$).

5.3.2.2 Determinação da atividade anti-hemolítica em eritrócitos humanos

Pôde-se observar-se que o EPVP, em altas concentrações, reduziu o dano osmótico induzido pela exposição à solução hipotônica de NaCl em sorotipos A, B e O (Tabela 6) (Figura 8).

Moreira et al. (2011) avaliaram a fragilidade osmótica da própolis verde e concluíram que a fragilidade da membrana aumenta sob condições de estresse oxidativo. A própolis diminuiu a fragilidade da membrana de eritrócitos, e, segundo os autores, o efeito de proteção da própolis é devido às suas propriedades antioxidantes.

Bilto e Adballa (1998) estudaram a habilidade da rutina e quercetina protegerem os eritrócitos contra danos externos e concluíram que estes flavonóides conseguem proteger a célula, evitando seu rompimento, em condições desfavoráveis.

Tais resultados estão de acordo com os achados neste estudo, indicando que a própolis vermelha, que possui flavonóides em sua composição, consegue proteger a célula em condições desfavoráveis.

Tabela 6. Atividade anti-hemolítica da alta concentração de EPVP em eritrócitos de tipo A, tipo B e tipo O na presença de solução hipotônica de NaCl. *p < 0,05

Tipo	Tratamento	Hemólise (%)
A	EPVP (1000 µg/mL)	59,00 ± 0,5773*
	NaCl (0,24%)	100,0 ± 0,5774
B	EPVP (1000 µg/mL)	78,00 ± 0,5773*
	NaCl (0,24%)	100,0 ± 0,5774
O	EPVP (1000 µg/mL)	96,00 ± 0,5774*
	NaCl (0,24%)	100,0 ± 0,5774

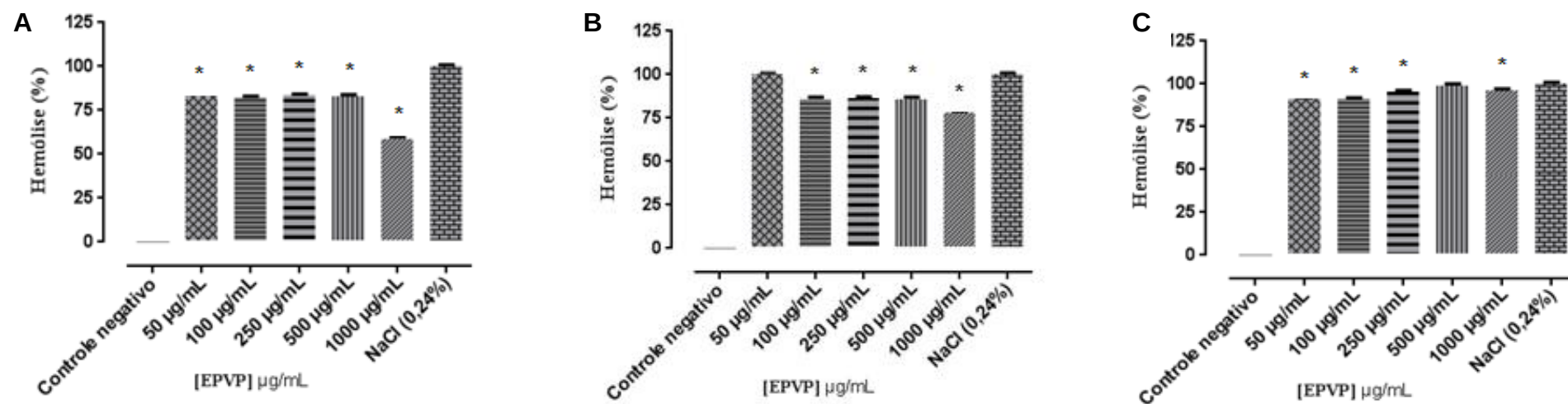


Figura 8. Atividade anti-hemolítica de EPVP contra eritrócitos de tipo A, B e O (A, B e C, respectivamente) na presença de solução hipotônica de NaCl (0,24%) (* p < 0,05).

5.3.2.3 Determinação da atividade oxidante e antioxidante do EPVP em hemoglobina humana

A avaliação do potencial oxidante do EPVP sobre hemoglobina humana demonstrou ausência de atividade oxidante, uma vez que todas as concentrações apresentaram baixos valores de produção de metHb quando comparados com valores obtidos para Ph (% metHb: $8,757 \pm 0,02848$), um comprovado agente oxidante (Figura 9) (Tabela 7) (WEFFORT-SANTOS et al., 2008).

Verificou-se ainda que o EPVP, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, foi capaz de reduzir de maneira significativa o efeito oxidante da fenilhidrazina. Nas demais concentrações, a percentagem de formação de metHb foi semelhante aos valores obtidos para Ph, um comprovado agente oxidante (Figura 10) (Tabela 8) (WEFFORT-SANTOS et al., 2008).

Trusheva et al. (2006) relataram que o ácido caféico isolado da própolis vermelha de Alagoas apresentou atividade antioxidante em até 85% comparado ao controle positivo fenilhidrazina. Frozza et al (2013) também relataram efeito antioxidante com a própolis vermelha de Alagoas. Em um estudo envolvendo sete tipos de própolis orgânica do Sul do Brasil, Tiveron et al. (2016) relataram alta atividade antioxidante dos extratos alcoólicos das mesmas.

Além disso, outros autores avaliaram efeito antioxidante do extrato alcoólico da própolis vermelha. Oldoni et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante da própolis vermelha de Alagoas em seu extrato hidroalcoólico, bem como seus compostos químicos isolados, vestitol, neovestitol e isoliquiritigenina. Os autores relataram uma maior atividade antioxidante do vestitol, seguido do extrato hidroalcoólico, neovestitol e isoliquiritigenina. De fato, os isoflavonóides já foram considerados os compostos com maior potencial antioxidante (LEE et al., 2005). Silva et al. (2017) avaliaram o efeito antioxidante no extrato hidroalcoólico da própolis vermelha de Sergipe e concluíram que este efeito é concentração-dependente e que a concentração de 750 µg/mL exibiu o maior efeito.

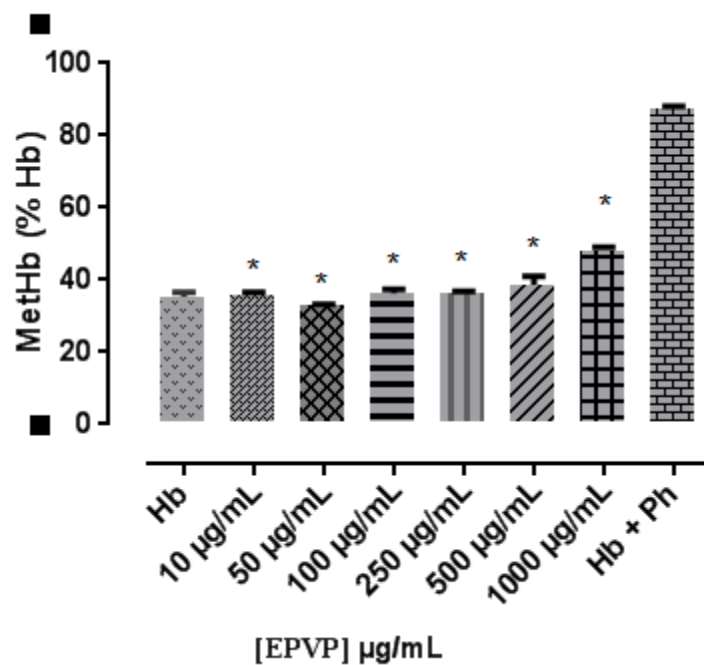


Figura 9. Atividade oxidante de EPVP sobre hemoglobina humana (* p < 0,05).

Tabela 7. Atividade oxidante do EPVP sobre hemoglobina humana versus controle positivo (Hb + Ph) (* p < 0,05).

Tratamento	MetHb (% Hb)
Hb + Ph (controle positivo)	87,57 ± 0,02848
EPVP (10 µg/mL) + Hb	35,93 ± 0,03180*
EPVP (50 µg/mL) + Hb	32,97 ± 0,02028*
EPVP (100 µg/mL) + Hb	36,30 ± 0,06245*
EPVP (250 µg/mL) + Hb	36,53 ± 0,02028*
EPVP (500 µg/mL) + Hb	38,67 ± 0,1342*
EPVP (1000 µg/mL) + Hb	48,17 ± 0,05548*
Hb (controle negativo)	35,30 ± 0,06928

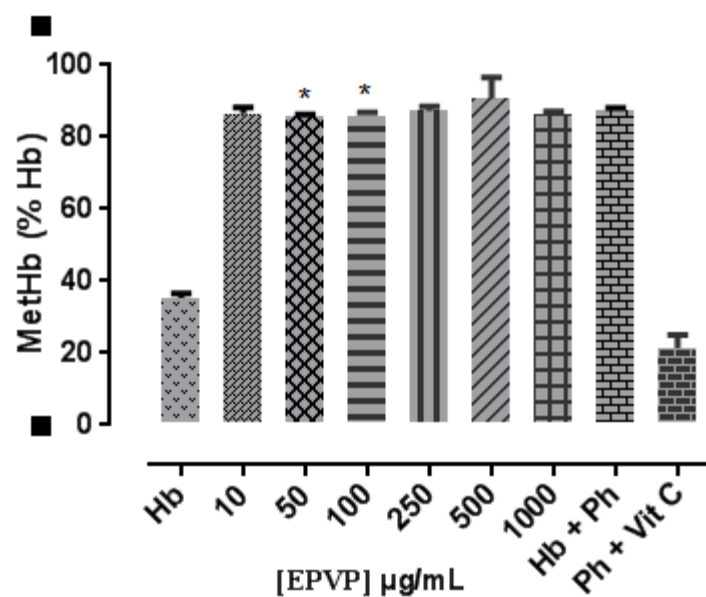


Figura 10. Atividade antioxidante de EPVP sobre hemoglobina humana humana versus controle positivo (Hb + Ph) (* p < 0,05).

Tabela 8. Atividade antioxidante de EPVP sobre hemoglobina humana humana (* p < 0,05).

Tratamento	MetHb (% Hb)
Hb + Ph (controle positivo)	87,57 ± 0,02848
Ph + Vit C	21,43 ± 0,2085
EPVP (10 µg/mL) + Hb	86,67 ± 0,08819
EPVP (50 µg/mL) + Hb	85,57 ± 0,04096*
EPVP (100 µg/mL) + Hb	86,10 ± 0,04041*
EPVP (250 µg/mL) + Hb	87,23 ± 0,07424
EPVP (500 µg/mL) + Hb	87,37 ± 0,03180
EPVP (1000 µg/mL) + Hb	86,93 ± 0,003333
Hb (controle negativo)	35,30 ± 0,06928

Neste estudo, o maior efeito antioxidante foi verificado na concentração de 50 µg/mL, o que não denota um resultado concentração-dependente, em discordância ao estudo citado anteriormente.

5.3.3 Determinação da atividade coagulante, vasoconstrictora e hemorrágica em membrana corioalantóide de ovo de galinha

A membrana corioalantoide foi proposta como modelo para uma membrana viva por possuir uma vasculatura funcional. Os efeitos agudos induzidos por uma substância de teste nos pequenos vasos sanguíneos e nas proteínas desta membrana são semelhantes àqueles induzidos no teste do olho de coelho (BAGLEY et al., 1994). Estudos foram conduzidos para avaliar a viabilidade de usar a membrana corioalantóide como uma substituição completa para o teste ocular de coelho *in vivo* e concluíram que este teste possui várias vantagens, a saber: simplicidade, rapidez, sensibilidade, facilidade de desempenho e baixo custo (VARGAS et al., 2007). As leis atuais que regulam a experimentação animal permitem protocolos usando embriões de frango sem autorização dos comitês de experimentação animal. O *British Animal Welfare Act* (1986) afirma que um ovo de embrião até 10 dias de idade gestacional pode ser usado como teste não- animal (BAGLEY et al., 1994; VARGAS et al., 2007).

Foi observado que as diferentes concentrações de EPVP (75 µg/mL, 125 µg/mL e 250 µg/mL), não promoveram hemorragia, coagulação nem vasoconstricção e consequentemente não apresentaram potencial irritante ou citotoxicidade (Tabela 9) (Figura 11). Dado os resultados ausência de citotoxicidade, as aplicações clínicas desta substância tornam-se possíveis e pouco arriscadas.

Tabela 9. Biocompatibilidade do EPVP com a membrana corioalantóide de ovo de galinha.

Tratamento	Índice IS	Tipo de efeito
DMSO 5%	0	NO
Própolis Vermelha 75 µg/mL	0,23 ± 0,26	Sem irritação
Própolis Vermelha 125 µg/mL	0,57 ± 0,16	Sem irritação
Própolis Vermelha 250 µg/mL	0,86 ± 0,12	Sem irritação

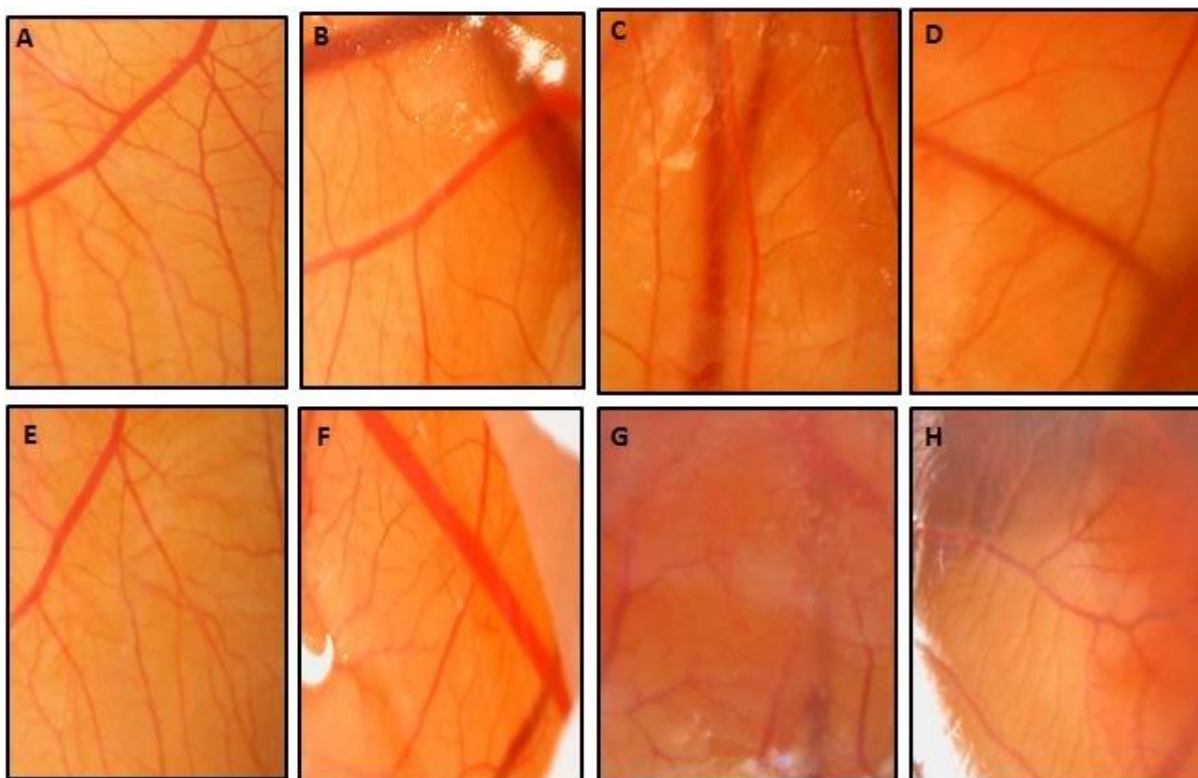


Figura 11. Biocompatibilidade do EPVP com a membrana corioalantóide de ovo de galinha. Foram avaliados pontos de hemorragia, coagulação e vasoconstrição. (A) antes da aplicação do DMSO 5% (controle negativo); (B) antes da aplicação da própolis vermelha a 75 µg/mL; (C) antes da aplicação da própolis vermelha a 125 µg/mL; (D) antes da aplicação da própolis vermelha a 250 µg/mL; (E) após a aplicação do DMSO 5%; (F) após a aplicação da própolis vermelha a 75 µg/mL; (G) após a aplicação da própolis vermelha a 125 µg/mL; (H) após a aplicação da própolis vermelha a 250 µg/mL (2x).

5.3.4 Avaliação da genotoxicidade do EPVP

5.3.4.1 Determinação do potencial clastogênico e aneugênico em eritrócitos de roedores

Os micronúcleos são indicativos de aberrações cromossômicas numéricas e/ou estruturais durante a mitose celular. Um aumento na frequência do número de micronúcleos nos animais de teste é uma indicação de dano cromossômico (LOU et al., 2007).

O teste do micronúcleo é o ensaio mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo

internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Assim, quando um produto em teste aumenta a frequência de eritrócitos micronucleados, há a indicação de que ele interfere na divisão nuclear dos eritroblastos da medula, quebrando cromossomos ou interferindo na formação do fuso, levando ao aparecimento de fragmentos de cromatina ou cromossomos inteiros, que não se incorporaram ao núcleo das células-filhas, os micronúcleos (COSTA; SILVA; NEPOMUCENO, 2010).

Os micronúcleos podem ser observados tanto em amostras de medula óssea, quanto em amostras de sangue periférico. Estudos demonstram que, em camundongos, o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos, uma vez que o baço não remove eritrócitos contendo micronúcleos (DERTINGER et al., 2006). Vários estudos comprovam que o sangue periférico pode ser utilizado de forma eficaz na detecção de agentes genotóxicos (HAYASHI et al., 2000; HAMADA et al., 2001). O teste do micronúcleo proporciona a realização com amostras de sangue periférico e dispensa o árduo trabalho de coleta de medula óssea dos animais, utilizando uma pequena quantidade de amostra de sangue para sua realização (HAMADA et al., 2001; DERTINGER et al., 2006).

Alguns autores usaram o teste de micronúcleo como biomarcador para instabilidade cromossômica e malignidade, observando frequências mais altas de células micronucleadas entre pacientes com câncer do que entre indivíduos saudáveis (LOU et al., 2007).

Para analisar a genotoxicidade da própolis vermelha, realizou-se o protocolo de micronúcleo, buscando verificar a frequência de formação dessas estruturas em hemácias de sangue periférico de camundongos.

Os resultados mostraram que esta substância, na dose de 2000 mg/Kg administrada v.o., não induziu um aumento significativo no número de micronúcleos em relação ao controle positivo, representado pela droga ciclofosfamida ($p > 0,05$), não apresentando, portanto, atividade clastogênica e aneugênica. Apenas a ciclofosfamida (controle positivo) induziu um aumento significativo na quantidade de micronúcleos ($p < 0,05$) (Tabela 9) (Figura 12).

Além disso, o extrato de própolis vermelha (EPVP) reduziu a formação dos micronúcleos, quando comparado ao grupo controle positivo, apresentando, portanto, atividade anticlastogênica e antianeugênica.

Tabela 10. Frequência de micronúcleos em 2000 eritrócitos de sangue periférico de camundongos de diferentes grupos experimentais versus controle positivo Ciclofosfamida. * $p < 0,05$

Grupos	N° de células micronucleadas
Controle negativo	$12,7 \pm 0,29$
Controle positivo – Ciclofosfamida (50mg/Kg)	$43,5 \pm 5,89$
EPVP (2000 mg/Kg)	$11,7 \pm 0,50^*$
EPVP + Ciclofosfamida	$20,5 \pm 3,90^*$



Figura 12. Fotomicrografia óptica ilustrativa de eritrócitos micronucleado em sangue periférico de camundongos Swiss na presença da ciclofosfamida (50mg/Kg) (1000X).

5.3.5 Avaliação da toxicidade aguda do EPVP

Ao analisar os resultados da toxicidade aguda do EPVP, pôde-se observar que a administração oral deste composto numa dose de 2000 mg/Kg não produziu efeitos tóxicos em camundongos, uma vez que durante o tratamento não foram observados sinais clínicos visíveis de toxicidade. Durante a observação de parâmetros comportamentais não foi possível notar quaisquer alterações após a administração desta substância (Tabela 10).

O EPVP na dose de 2000 mg/Kg não provocou nenhuma morte, fazendo com que ele se enquadre da categoria 5 do Sistema de Classificação Harmonizado Globalmente e com uma DL_{50} estimada entre 2000 e 5000 mg/Kg. Nesta dose foram evidenciados principalmente sinais depressores do sistema nervoso central (SNC), como diminuição da hiperatividade, sedação, ambulação diminuída, além de sinais relacionados ao sistema nervoso autônomo (SNA), como tônus muscular, defecação aumentada e força para agarrar. Todas as alterações desapareceram após 24h da administração.

O monitoramento do peso corporal do animal é importante indicador de avaliação da toxicidade de uma substância (JANH; GUNZEL, 1997). Os animais não demonstraram diferença estatística significativa entre o peso inicial e final entre os grupos tratado e controle. Além disso, os resultados da análise do consumo de água e ração demonstraram que a administração do EPVP alterou os níveis de consumo de ambos pelos camundongos. No entanto, ao correlacionar esses dados com os valores dos pesos dos animais, pôde-se observar que não houve mudança entre animais tratados e animais de controle neste experimento (Tabela 11).

Tabela 11. Alterações comportamentais observadas nos animais tratados com Própolis Vermelha na dose de 2000mg/Kg. [(-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso] n=6 (fêmeas).

Dose (mg/Kg; v.o.)	Tempo de observação (min)	Efeitos comportamentais
Própolis vermelha 2000 mg/Kg N=6	Até 30	(+) Hiperatividade; (-) Sedação; (-) Resposta ao toque diminuído; (-) Perda do reflexo auricular; (+) Defecação aumentada; (+) Ambulação; (+) Tônus muscular; (+) Força para agarrar
	60	(-) Hiperatividade; (+) Analgesia; (+) Sedação; (-) Agressividade; (-) Perda do reflexo auricular; (-) Ambulação; (+) Defecação aumentada; (+) Tônus muscular; (+) Força para agarrar
	120	(-) Hiperatividade; (+) Analgesia; (+) Sedação; (-) Perda do reflexo auricular; (-) Ambulação; (+) Defecação aumentada; (+) Tônus muscular; (+) Força para agarrar
	180	(+) Hiperatividade; (-) Analgesia; (-) Sedação; (+) Tônus muscular; (+) Defecação aumentada; (+) Força para agarrar
	240	(-) Hiperatividade; (-) Analgesia; (-) Sedação; (+) Tônus muscular; (+) Defecação aumentada; (+) Força para agarrar

Tabela 12. Efeitos do tratamento agudo com EPVP na avaliação do peso inicial e final e consumo de água e ração pelos camundongos. * $p < 0,05$ teste versus controle

Grupos	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	$32,25 \pm 0,3014$	$20,08 \pm 0,0057$	$27,21 \pm 0,0057$	$31,61 \pm 0,0057$
Tratado	$29,52 \pm 0,3586$	$16,94 \pm 0,0318$	$30,16 \pm 0,0057$	$33,41 \pm 0,0057$

O exame macroscópico dos órgãos não revelou alterações morfológicas visíveis. Os resultados de pesos de órgãos exibiram alterações no tratamento agudo e controle nos seguintes órgãos: coração, estômago, baço e pulmão (Tabela 12).

Tabela 13. Efeitos do tratamento agudo com EPVP na avaliação dos órgãos dos camundongos. * $p < 0,05$ teste versus controle

Grupos	Índice de coração (g)	Índice de fígado (g)	Índice de rins (g)	Índice de estômago (g)	Índice de baço (g)	Índice de pulmão (g)
Controle	$0,0040 \pm 0,0005$	$0,060 \pm 0,0005$	$0,0120 \pm 0,0005$	$0,0170 \pm 0,0005$	$0,0100 \pm 0,0005$	$0,0190 \pm 0,0005$
Tratado	$0,0050 \pm 0,0005^*$	$0,0600 \pm 0,005$	$0,0120 \pm 0,0005$	$0,0140 \pm 0,0005^*$	$0,0060 \pm 0,0005^*$	$0,0140 \pm 0,0005^*$

Os resultados da análise de parâmetros bioquímicos de glicemia, triglicerídeos e colesterol revelaram diferença estatística entre os animais do grupo controle e aqueles tratados com própolis vermelha. Os animais tratados com EPVP apresentaram níveis de glicemia e colesterol menor do que o grupo controle, enquanto que o nível de triglicerídeos pareceu levemente aumentado, sugerindo que o estudo de dose de administração deste composto é capaz de alterar o metabolismo de carboidratos e lipídios em camundongos. O nível de proteínas totais também apresentou uma leve alteração, a menor, no grupo

tratado com EPVP. Não houve alteração nos níveis plasmáticos de albumina (Tabela 13).

Tabela 14. Efeitos do tratamento agudo com EPVP em parâmetros bioquímicos: glicemia, colesterol triglicérides e albumina em camundongos. * $p < 0,05$ teste versus controle

Grupos	Glicemia	Colesterol	Triglicérides	Albumina	Proteínas totais
Controle	234,0 ± 0,577	97,30 ± 0,0577	70,00 ± 0,577	1,950 ± 0,0057	5,400 ± 0,0057
Tratado	217,0 ± 0,577*	80,00 ± 0,577*	76,80 ± 0,0577*	2,000 ± 0,057	5,230 ± 0,00577*

Após esta fase, os órgãos (rins e fígado) foram submetidos à análise histológica para detectar possíveis danos à estrutura celular.

Os rins apresentaram parênquima renal sem alterações tróficas, ausência de fibrose intersticial, porém apresentando evidências de infiltrado inflamatório leve (Figura 13). O fígado apresentou tecido hepático com arquitetura geral preservada, sem evidências de fibrose portal ou pericelular. Ainda foi constatada ausência de dilatação sinusoidal, hepatócitos normotróficos sem evidências de esteatose. Os espaços-porta apresentavam-se sem alterações histológicas (Figura 14).

Associado a isso, foram observadas diminuições nos valores de uréia, ácido úrico, AST e ALT com diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratado e controle (Tabela 14). A uréia é um marcador importante da função renal, pois é o principal produto do metabolismo protéico excretado pelos rins, e portanto, os níveis sanguíneos deste metabólito são utilizados para avaliar a taxa de filtração glomerular. Os níveis reduzidos de uréia e ácido úrico proporcionam uma melhoria da função renal, sugerindo a sua utilização no tratamento da insuficiência renal aguda assim como pode indicar uma diminuição do catabolismo protéico.

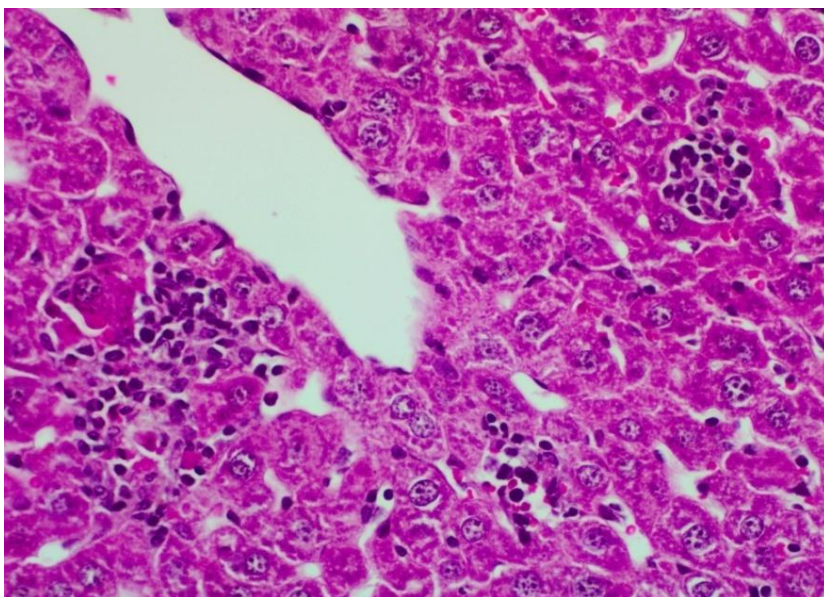


Figura 13. Infiltrado inflamatório parenquimatoso leve foi observado nos rins de camundongos tratados com EPVP 2000 mg/Kg (400x).

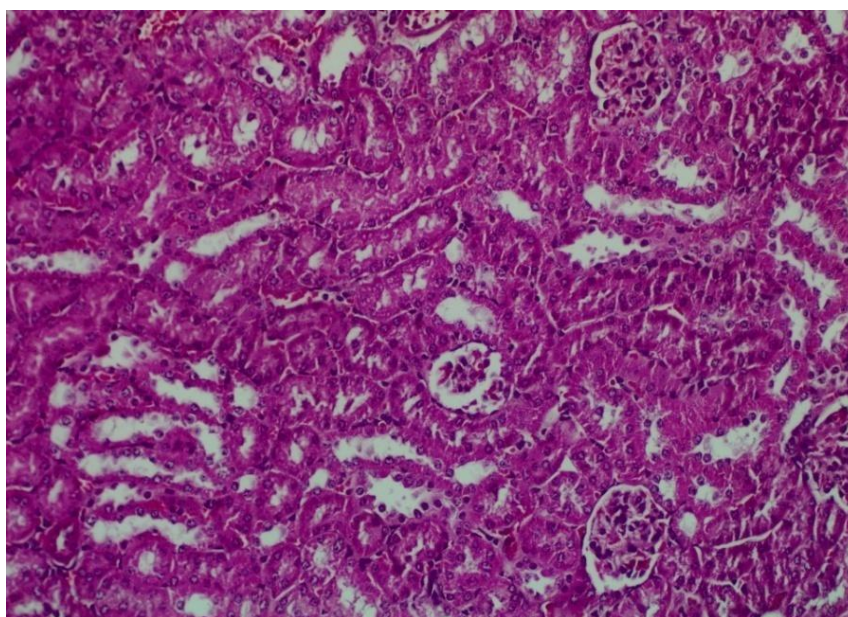


Figura 14. Não foi evidenciado sinal de infiltrado inflamatório em fígado de camundongos tratados com EPVP 2000 mg/Kg (400x).

A análise das enzimas ALT e AST são marcadores importantes de lesões hepáticas. A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima encontrada livre no plasma dos hepatócitos. Ela catalisa a reação de transaminação reversível de alanina e 2-cetoglutarato em piruvato e glutamato, e utiliza como cofator o piridoxal-fosfato (THRALL et al., 2015). Já a enzima aspartato aminotransferase (AST) é encontrada predominantemente no citosol e, em menor quantidade, nas mitocôndrias dos hepatócitos e nas células musculares esqueléticas e cardíacas. Ela promove a catalisação de transaminação reversível de aspartato e 2-cetoglutarato em oxalacetato e glutamato, e também tem como cofator o piridoxal-fosfato (GONZALEZ; SILVA, 2006). Os valores de ALT e AST podem ser induzidos a alterações em várias situações como hipóxia, acúmulo de lipídeos hepáticos, doenças bacterianas e virais, inflamações, neoplasias hepáticas, endo e exotoxinas, além de intoxicações medicamentosas (THRALL et al., 2015; GONZALEZ; SILVA, 2006).

Bueno-Silva et al. (2016) relataram que o extrato etanólico de própolis vermelha, em administração subcutânea (10 mg/Kg), conseguiu reduzir a quimiotaxia de neutrófilos bloqueando canais de cálcio e os mediadores químicos inflamatórios foram significativamente reduzidos. Franchin et al. (2016a) relataram que o neovestitol, um isoflavonóide isolado da própolis vermelha, reduziu inflamação aguda e crônica em camundongos quando administrado via subcutânea numa dose de 3 e 10 mg/Kg. Os mesmos autores sugeriram efeito anti-inflamatório para o vestitol, outro isoflavonóide isolado da própolis vermelha, na dosagem de 3 e 10 mg/Kg, via subcutânea (FRANCHIN et al., 2016b). Além disso, um estudo com formononetina, um isoflavonoide isolado da própolis vermelha brasileira, mostrou que a administração deste composto em modelos de inflamação experimental em camundongos reduziu a migração de leucócitos e formação de edema (CAVENDISH et al., 2015).

Nesse estudo, foi observada inflamação leve em parênquima renal. No entanto, a dose administrada (2000 mg/Kg) foi maior do que nos estudos citados. Observou-se diminuição nos níveis de úreia, ácido úrico, AST e ALT, demonstrando sinais de nefro e hepatoproteção.

Boutabet et al. (2011) realizaram testes *in vivo* com ratos *Wistar* e observaram que o extrato à base de própolis apresentou efeito protetor contra a

toxicidade renal de agentes quimioterápicos. O efeito protetor da própolis foi atribuído ao flavonóide (quercetina) encontrado no extrato.

Tabela 15. Efeitos do tratamento agudo com EPVP em parâmetros bioquímicos uréia, ácido úrico, ALT e AST de camundongos. * $p < 0,05$ teste versus controle

Grupos	Uréia	Ácido úrico	AST	ALT
Controle	61,30 $\pm$ 0,05774	1,410 $\pm$ 0,005773	267,0 $\pm$ 0,577	148,0 $\pm$ 0,577
Tratado	52,80 $\pm$ 0,05774*	0,5400 $\pm$ 0,0057*	237,5 $\pm$ 0,0577*	79,80 $\pm$ 0,0577*

Estudos indicam que os flavonóides apresentam diferentes mecanismos de ação na inflamação: podem agir inibindo a síntese de $\text{TNF-}\alpha$, bloquear as enzimas fosfolipase, cicloxigenase (COX) 1 e 2 ou as lipoxigenases (AGNIHOTRI et al., 2010; BARROS, 2012). Apigenina e quercetina inibem a COX-2 e a NOS. A quercetina também age reduzindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio vascular, mesmo modo de ação da luteolina (BARROS, 2012). Rutina, apigenina-7-O-glicosídeo e luteolina-7-O-glicosídeo, inibem a elastase neutrofílica humana (HNE) e as metaloproteinases da matriz, as quais estão associadas a processos anti-inflamatórios em estudos *in vitro*. O flavonoide caempferol-3-O- β -d-galactosídeo inibe a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e a NOS, possuindo uma significativa atividade anti-inflamatória (AGNIHOTRI et al., 2010).

Segundo Berretta et al. (2017), é importante considerar o investimento em ensaios clínicos, com o objetivo de explorar os benefícios observados com o uso tradicional e em estudos com animais, a fim de refinar as dosagens e formulações, no que diz respeito ao desenvolvimento de medicamentos envolvendo este fabuloso material natural produzido por abelhas com o apoio da biodiversidade brasileira.

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, foi observado que a própolis vermelha apresenta inúmeras propriedades farmacológicas, podendo ser

considerada como potencial alternativa para o desenvolvimento de futuros medicamentos. Esta substância apresentou atividade antibacteriana sobre os micro-organismos planctônicos e não-planctônicos formadores do biofilme dental e em sua Concentração Inibitória Mínima não induziu a morte em *A. salina* nem induziu lesões na membrana celular, apresentando ainda atividade antioxidante. Além disso, não apresentou-se potencialmente irritante nem sugeriu danos cromossômicos. Sua administração aguda por via oral sugere nefro e hepatoproteção, indicando a necessidade de mais pesquisas toxicológicas *in vitro* e *in vivo* para esclarecer o papel desta substância e seus derivados.



Conclusões

6 CONCLUSÕES

O presente estudo avaliou a toxicidade e a atividade do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EPVP) produzido a partir da resina de *Dalbergia ecastophyllum* (Paraíba, Brasil) sobre bactérias de importância odontológica. Diante dos resultados obtidos podemos concluir que o EPVP:

- ✓ Apresentou flavonóides como compostos majoritários;
- ✓ Apresentou atividade antibacteriana do tipo bactericida contra espécies de *Streptococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- ✓ Apresentou atividade antibacteriana sinérgico para *S. mutans*, *S. oralis* e *S. salivarius* e efeito aditivo para *S. mitis*, *S. sanguis* e *P. aeruginosa* quando associados à clorexidina;
- ✓ Apresentou atividade antibacteriana contra biofilme uniespécie e multiespécie de *Streptococcus*;
- ✓ Não induz a morte do microcrustáceo *A. salina*;
- ✓ Induziu baixo percentual de hemólise frente a eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O;
- ✓ Protegeu os eritrócitos dos grupos sanguíneos A, B e O de lise na presença de soluções hipotônicas de NaCl;
- ✓ Não induziu a oxidação da hemoglobina e apresentou efeito antioxidante;
- ✓ Não induziu vasoconstrição, coagulação nem hemorragia sobre a membrana corioalantóide de ovo de galinha;

- ✓ Não induziu atividade aneugênica e nem clastogênica e apresentou efeito anti-mutagênico;
- ✓ Não induziu alterações comportamentais, não alterou o peso corporal nem consumo de água e ração. Os valores de uréia, ácido úrico, ALT e AST foram reduzidos sugerindo nefro e hepatoproteção. O exame macroscópico dos órgãos não revelou alterações morfológicas visíveis e o exame histopatológico revelou a ocorrência de leve infiltrado renal que deve ser melhor investigado.



Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, J.A.; PASTER, B.J.; STOKES, L.N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol.** v.43, p.5721–32, 2005.
- AGNIHOTRI, S.; WAKODE, S.; AGNIHOTRI, A. An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. **IJNPR.** v.1, n.2, p.150-67, 2010.
- AGWU, E.; IHONGBE, J.C.; EZEONWUMELU, J.O.; LODHI, M.M. Baseline burden and antimicrobial susceptibility of pathogenic bacteria recovered from oral lesions of patients with HIV/AIDS in South-Western Uganda. **Oral Sci Int.** v.12, p.59–66, 2015.
- ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis, **J. Ethnopharmacol.** v.113, p.278–283, 2007.
- ALMEIDA, M.C.; FERREIRA, L.C.L.; VENÂNCIO, G.N.; SOUZA, R.F.S.; LIMA, E.S.; CONDE, N.C.O.; BANDEIRA, M.F.C.B. Biocompatibility of propolis in subcutaneous tissue of rats: a possible biomaterial for cavity cleansing. **Rev Odonto Cienc.**, v.32, n.2, p. 60-65, 2017.
- AMARANTE, C.B. MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de *Montrichardia linifera*. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ANVISA. Guia para a avaliação da segurança de produtos cosméticos, 2012. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em 10 out 17.
- APARICIO, R. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **J of Pharm Biom Anal.** v. 39, p. 1063-1067, 2005.
- ARAUJO, M.T.B.; ARAUJO, R.P.C.; CAMPOS, E.J. Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade bactericida da clorexidina 0,12% e 0,2% e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplax. **Rev. Odonto Ciênc.**, v.16, n.33, 2001.
- BACT, M.B.; ARCE, R.; BOTERO, J.; MAG, A.J.; CRUZ, C.; CONTRERAS, A.; Micro-organismos inusuales em surcos y bolsas periodontales. **Colomb Med**, v.1, p.6 - 14. 2006.
- BAGLEY, D.M.; WATERS, D.; KONG, B.M. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. **Food Chem Toxicol**, v.32, p.1155–60, 1994.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem.** v. 99, n.1, p.191-203. 2006.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evid-bas Complem Altern Med**, v.2, p. 29–32, 2005.

BARROS, M.C.T.C. Preparação de novos derivados flavonoides com potencial atividade biológica. **Dissertação Mestrado**. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2012.

BERRETTA, A.A.; ARRUDA, C.; MIGUEL, F.G.; BAPTISTA, N.; NASCIMENTO, A.P.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; HORI, J.I.; BARUD, H.S.; DAMASO, B.; RAMOS, C.; FERREIRA, R.; BASTOS, J.K. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market in: WAISUNDARA, V.; SHIOMI, N. (Org.) **Agric Biol Sci**, InTech, 2017.

BHADAURIA, M.; NIRALA, S.K.; SHUKLA, S. Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. **Food Chem Toxicol**, v.46, n.8, p.2703-12, 2008.

BILTO, Y.Y.; ABDALLA, S.S. Effects of selected flavonoids on deformability, osmotic fragility and aggregation of human erythrocytes. **Clin Hemorheol Microcirc.** v. 18, n.2p.165-73, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 849, de 27 de março de 2017. Inclui a Arteterapia, Ayurveda, Biodança, Dança Circular, Meditação, Musicoterapia, Naturopatia, Osteopatia, Quiropraxia, Reflexoterapia, Reiki, Shantala, Terapia Comunitária Integrativa e Yoga à Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, 2017. Disponível em: http://dab.saude.gov.br/portaldab/noticias.php?conteudo=_&cod=2297, acesso em 23/12/2017.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 97 de 01 de Agosto de 2016**. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2920496/RDC_97_2016.pdf/91a1e44c-be5d-4f78-8016-fe88ae13e2ad, acesso em 23/12/2017.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. Brasília, 48 p. 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Caderno de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares. Plantas medicinais e Fitoterapia na Atenção básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 154 p. 2012.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 92p. 2006.

BOUTABET, K.; KEBSA, W.; ALYANE, M.; LAHOUEL, M. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. **Ind J Nephr** v.21, n.2: 101-106, 2011.

BUENO-SILVA, B.; KOO, H.; FALSETTA, M.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of Neovestitol-vestitol containing Brazilian red propolis on biofilm accumulation in vitro and dental caries development in vivo. **Biofouling**, v. 29, n. 10, 2013a.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; KOO, H.; IKEGAKI, M.; SILVA, G.V.; NAPIMOGA, M.H.; ROSALEN, P.L. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 19, p. 4546-4550, 2013b.

BUENO-SILVA, B.; FRANCHIN, M.; ALVES, C.F.; DENNY, C.; COLÓN, D.F.; CUNHA, T.M.; ALENCAR, S.M.; NAPIMOGA, M.H.; ROSALEN, P.L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory process. **Phytomedicine**, v.23, p.1583–1590, 2016.

BÚFALO, M.C.; CANDEIAS, J.M.G.; SFORCIN, J.M. *In vitro* effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (Hep-2) cells. **Evid-bas Complem Altern Med**, v.6, n.4:483-7, 2009.

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

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; KEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quím Nova**, v.32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 22nd Informational Supplement M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

CAMARGO, R.A. A tribo Dalbergieae (Leguminosae-Faboideae) no estado de Santa Catarina, Brasil. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Programa de Pós Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.140p.

CARVALHO, I. Introduction to molecular modeling of drugs in the medicinal chemistry experimental course. **Quim Nova**, v.26, 2003.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M; KEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Quím Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CASTALDO, S; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 1, n.1, 2002.

CAVENDISH, R.L.; SANTOS, J.S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A.O; OLIVEIRA, V.J.; ARAUJO, E.D.; SILVA, A.A.B.; THOMAZZI, S.M.; CARDOSO, J.C.; GOMES, M.Z. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **J. Ethnopharmacol.**, v.173, p. 127–133, 2015.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antib in Labor Med**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COSTA E SILVA, A.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos periféricos de mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) do rio Paranaíba. **Rev Núcl Interd Pesq Ext UNIPAM**, v.1, p. 167-179, 2010.

CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red and yellow Cuban varieties of propolis. **J Agric Food Chem**, v.5, p. 7502-7509, 2007.

CURY, J.A. Controle químico da placa dental. In: Kringer, L.(coord). **Prom de Saúde Bucal**. São Paulo: ABOPREV/ Artes Médicas, cap. 7, p.131-140, 1997.

DACIE, J.; LEWIS, S. M. **Pract Haemat**. London: Churchill Livingstone, 2001

DAUGSCH, A. MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evid-bas Complem Altern Med**, v.5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DERTINGER, S. D.; BISHOP, M. E.; McNAMEE, J. P.; Hayashi, M.; SUZUKI, T.; ASANO, N.; NAKAJIMA, M.; SAITO, J.; MOORE, M.; TOROUS, D. K.; MACGREGOR, J. T. Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: i. intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring. **Tox Sciences**, v. 94, n. 1, p. 83-91, 2006.

DUARTE, S.; ROSALEN, P.L.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; BOWEN, W.H.; MARQUIS, R.E.; REHDER, V.L.; SARTORATTO, A.; IKEGAKI, M.; KOO, H. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Arch Oral Biol**, v. 51, n. 1, 2006

ELIOPOULUS, G.M.; MOELLERING, R.C. In: LORIAN, V. (ed) **Antib Lab Medicine**; Baltimore, Md: The Williams & Wilkins Co., 432-492, 1991.

ESPINEL-INGROFF, A.; CHATURVEDI, V.; FOTHERGILL, A.; RINALDI, M. G. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. **J Clin Microb**, v.40, n.10, p. 3776-3781, 2002.

EUMKEB, G.; CHUKRATHOK, S. Synergistic Activity and Mechanism of Action of Ceftazidime and Apigenin Combination against Ceftazidime-Resistant *Enterobacter cloacae*. **Phytomed**, v.20, p.262-269, 2013.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**. 1. ed. São Paulo: Santos, 2005.

FERES, M.; FIGUEIREDO, L.C.; BARRETO, I.M.; COELHO, M.H.; ARAUJO, M.W.; CORTELLI, S.C.. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. **J Int Acad Periodontol**, v.7, p.90-96, 2005.

FRANCHIN, M.; COLÓN, D.F.; DA CUNHA, M.G.; CASTANHEIRA, F.V.; SARAIVA, A.L.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; CUNHA, T.M.; ROSALEN, P.L. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. **Sci Rep.**, v.6, 2016a.

FRANCHIN, M.; COLÓN, D.F.; CASTANHEIRA, F.V.; DA CUNHA, M.G.; BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S.M.; CUNHA, T.M.; ROSALEN, P.L. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. **J Nat Prod**. v.79, n.4, p.954-60, 2016b.

FREIRES, I.A.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P.L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **Eur J Med Chem**, v.110, p.267-79, 2016.

FROZZA, C. D. S., GARCIA, C. S. C., GAMBATO, G., SOUZA, M. D., SALVADOR, M., MOURA, S., PADILHA, F. F., SEIXAS, F. K., COLLARES, T., BORSUK, S., DELLAGOSTIN, D. A., HENRIQUES, J. A. P., & ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem Tox**, v.52, p.137-142, 2013.

GEBARA, E.C.E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic 141 bacteria. **Braz J Microbiol**, v.33, n.4: 365-9. 2002.

GEBRAN, M. P.; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. **Ciênc e Cult**, v.26, n.3: 45-58, 2002.

GERALDINI, C.A.C.; SALGADO, E.G.C.; RODE, S.M. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária - avaliação ultra-estrutural. **Rev Fac Odonto**, v.3: 37-42, 2000.

GIUSTI, F.; MICGLIETTA, R.; PEPE, P.; SEIDENARI, S. Sensitization to propolis in 1255 children undergoing patch testing. **Contact Dermatitis**. V. 51, p.255-8, 2004.

GONZALEZ, F.H.D; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2006.

GURENLIAN, J. R. The role of dental plaque biofilm in oral health. **J Dental Hyg**, v.81, n.5, 2007.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochem Anal**, v.11, p. 137-147, 2000.

HAMADA, S.; SUTOU, S.; MORITA, T. et al.Evaluation of the Rodent Micronucleus Assay by a 28-Day Treatment Protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). **Envir and Mol Mutag**, v. 37, p. 93-110, 2001.

HAYACIBARA, M.F.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BOWEN, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol**, v.101, p. 110-115, 2005.

HAYACIBARA, M.F.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BOWEN, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharm**, v. 101, n. 1, p. 110-115, 2005.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCH-VOLDERS, M. OLESON, F. B. JR; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mut Res**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HAYASHI, M. MACGREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; ADLER, I.D.; BLAKEY, D.H.; DERTINGER, S.D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Envir and Mol Mutag**, v. 35, n. 3, p. 234-252, 2000.

HENRY, J. B. **Diagn clín e tratam por méts laborat**. Barueri: Manole, 2008.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R.L. Bacterial interactions in dental biofilm. **Virulence**, v.2, n.5, p. 435-44, 2011.

INOUE, K.; SAITO, M.; KANAI, T.; KAWATA, T.; SHIGEMATSU, N.; UNO, T.; ISOBE, K.; LIU, C.H.; ITO, H. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line in vivo and in vitro. **Am J Chin Med**, v.36, n.3, p.625-34, 2008.

INOUE, H.T.; SOUSA, I E.A.; ORSI, R.O.; FUNARI,S.R.C.; BARRETO, L.M.R.C.; DIB, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Arch Latin Produc Animal**, v. 15, n. 2, p. 65-69, 2007.

JAHN, A.I.; GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reprod Toxicol**, v.11, p.171-178, 1997.

JONES, C.G. Chlorhexidine: is it still the gold standart? **Periodontol** 2000, v.15, p. 55-62, 1997.

JUIZ, P.J.L.; ALVES, R.J.C.; BARROS, T.F. Use of natural products as adjuvant in the treatment of periodontal disease. **Rev Bras Farmacogn**, v.20, n.1, 2010.

KATRANCIOGLU, N.; KARAHAN, O.; KILIC, A.T.; ALTUN, A.; KATRANCIOGLU, O.; POLAT, Z.A.. The antiangiogenic effects of levosimendan in a CAM assay. **Microv Res**, n.83, p.263–266, 2012.

KINGHORN, A. D. The role of pharmacognosy in modern medicine. *Expert. Opin. Pharmacotherapy*, v.3, n.2, p. 77-9, 2002.

KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.; PARK, Y.Y.; CURY, J.A. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. **Arch Oral Biol.**, v.45, n.2:141-8, 2000.

KUETE, V,; FOZING, D.; KAPCHE, W.; MBAVENG, A.; KUIATE, J.; NGADJUI, B. et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. **J. Ethnopharmacol**, v.124, p.551-5, 2009.

LARINI, L. Avaliação toxicológica. In: LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole, 1999.

LAWRENCE, J.R.; ZHU, B.; SWERHONE, G.D.; TOPP, E.; ROY, J.; WASSENAAR, L.I.; REMA, T.; KORBER, D.R. Community-level assessment of the effects of the broad-spectrum antimicrobial chlorhexidine on the outcome of river microbial biofilm development. **Appl Environ Microbiol**, v.74, p.3541–3550, 2008.

LEE, C.H.; YANG, L.; XU, J.Z.; YEUNG, S.Y.V.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food Chem**, v.90, p. 735-741, 2005.

LEVYA, S.B.; MESA, X.M.C. Efectividad del uso del propóleo em el tratamiento de la estomatite aftosa. **Rev. Cub Estomatol.**, v.44, n.3, 2007.

LIM, K.S.; KAM, P.C.A Chlorhexidine –pharmacology and clinical appplications. **An Intens Care**, v.36, n. 4, p. 502- 512, 2008.

LOBO, P.L.D.; FONTELES, C.S.R.; MARQUES, L.A.R.V.; CARVALHO, C.B.M.; FONSECA, S.G.C.; JAMACARU, F.V.F.; MORAES, M.E.A. The efficacy of three formulations of Lippiasidoides Cham. essential oil in the reduction of salivary Streptococcus mutans in children withcaries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 1043-1047, 2014.

LÓPEZ, B.G.; SCHMIDT, E.M.; EBERLIN, M.N.; SAWAYA, A.C. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chem.**,v.146, p.174-80, 2014.

LOTTI, C.; CAMPO FERNANDEZ, M.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, D.; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. **J Agric Food Chem**, v.58, n.4, p. 2209-2213, 2010.

LOU, J.; HE, J.; ZHENG, W.; JIN, I.; CHEN, Z.; CHEN, S.; LIN, Y.; XU, S. Investigating the genetic instabil-ity in the peripheral lymphocytes of 36 untreated lung cancer patients with comet assay and micronucleus assay. **Mutat Res**, v. 617, p.104-110, 2007.

LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v.97, 199-206. 2005.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, p. 447-454, 2008.

MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, A.S.; COSTA, S.S.; SILVA, R.P.D.; SILVA, D.F. et al. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PLoS ONE**, v.10, n.8, 2015.

MACHADO, B.A.; SILVA, R.P.; BARRETO, G.D.E.A.; COSTA, S.S.; SILVA, D.F.; BRANDÃO, H.N.; ROCHA, J.L.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.; UMSZA-GUEZ, M.A.; PADILHA, F.F. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **PLoS One**, v. 11, n.1, 2016.

MACRAE, W.D.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 143-172, 1988.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26: 83–99, 1995.

MANARA, L.R.B.; ANCONI, S.I.; GROMATZKY, A.; CONDE, M.C.; BRETZ, W.A. Utilização da própolis em Odontologia. **Rev. FOB**, v.7:15-20, 1999.

MARRELLI, M.; AMANTEA, M.; TATULLO, M. A comparative, randomized, controlled study on clinical efficacy and dental staining reduction of a mouthwash containing Chlorhexidine 0.20% and Anti Discoloration System (ADS). **Annali di Stomatol**. v.6, p. 35-42, 2015.

MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.**, v.38, p.204-211. 2004

MARSH, P.D. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. **BMC Oral Health**, v.6, 2006.

MASSARO, C.F.; KATOULI, M.; GRKOVIC, T.; VU, H.; QUINN, R.J.; HEARD, T.A.; CARVALHO, C.; MANLEY-HARRIS, M.; WALLACE, H.M.; BROOKS, P. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). **Fitoterapia**, v.95, p. 247–257, 2014.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. “Bench-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update, p. 383-409. In: Rahman, A. (Org.). **Stud in Nat Prod Chem**, 9th ed., Elsevier, Amsterdam, 1991.

MENDONÇA, L.S.; MENDONÇA, F.M.R.; ARAÚJO, Y.L.F.M. ARAÚJO, E.D.; RAMALHO, S.A.; NARAIN, N.; JAIN, S.; DRELLANA, S.C.; PADILHA, F.F.; CARDOSO, J.C. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. **Food Sci Technol**, v. 35, n.2, p. 291-298, 2015.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Rev Bras Farmacog**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., McLAUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **J of Med Plant Res**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MILITAO, G.C.; JIMENEZ, P.C.; WILKE, D.V.; PESSOA, C.; FALCÃO, M.J.; SOUSA LIMA, M.A.; SILVEIRA, E.R.; DE MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Antimitotic proprieties os pterocarpan isolated from *Platymiscium floribundum* of sea urchin eggs. **Planta medica**, v. 71, n. 7, p. 683 – 685, 2005.

MOREIRA, F.P.M. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* - bioatividade sobre *Artemia salina*. **Quim Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

MOREIRA, L.; DIAS, T.; DIAS, L.G.; ROGÃO, M.; SILVA, J.P.; ESTEVINHO, L.M. Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach. **Food and Chem Tox**, v. 49, n. 2, p. 520-526, 2011.

NASCIMENTO, J.E.; MELO, A.F.M.; LIMA E SILVA, T.C.; VERAS FILHO, J.; SANTOS, E.M., ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C.; Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 29, n.2, p. 145-150, 2008.

NGUTA, J.M.; MBARIA, J.M.; GAKUYA, D.W.; GATHUMBI, P.K.; KABASA, J.D.; KIAMA, S.G. Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacology online**, v.2, p.458-78, 2011.

NUNES, LCC., GALINDO, AB., DEUS, ASO., ARCANJO, DDR., RANDAU, KP., XAVIER, HS., CITÓ, AMGL. and ROLIM-NETO, PJ. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Rev Bras Farmacog**, v.19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

OLDONI, T.L.C.; CABRAL, I.S.R.; D'ARCEA, M.A.B.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Sep Purif Techn**, v. 77, p. 208–213, 2011.

OLDONI, T.L.C.; OLIVEIRA, S.C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M.A.; SADO, R.Y.; MAIA, F.M.C.; ALENCAR, S.M.; LIMA, V.A. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected Bees *Apis mellifera*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v..26, n.10, 2015.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, p. 466-476, 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 474. Mammalian

erythrocyte micronucleus test. In: **OECD Guideline for the Testing of Chemicals**, 1997.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guidelines for the Testing of Chemicals**, OECD 423. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

ORSI, R.O.; FERNANDES, A.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M. The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against *Salmonella Typhi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. **Nat Prod Res**, v. 26, p.430-437, 2012.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Food Sci and Techn**, v.18, n.3, 1998.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.2, p. 997-1003, 2002.

PELLATI, F.; EPIFANO, F.; CONTALDO, N.; ORLANDINI, G.; CAVICCHI, L.; GENOVESE, S.; BERTELLI, D.; BENVENUTI, S.; CURINI, M.; BERTACCINI, A.; BELLARDI, M.G. Chromatographic methods for metabolite profiling of virus- and phytoplasma-infected plants of *Echinacea purpurea*. **J. Agric. Food Chem**, v.59, p. 10425–10434, 2011.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PHANSRI, K., SARNTHIMA, R., THAMMASIRIRAK, S., BOONCHALEE, P., KHAMMUANG, S. Antibacterial activity of *Bauhinia acuminata* L. seed protein extract with low hemolytic activity against human erythrocytes. **Chiang Mai J Sci**, v.38, p. 242-251. 2011.

PICCINELLI, A.L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by highperformance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J Agric Food Chem**, v.59, n.12, p.6484-91, 2011.

PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. Effect of green propolis extracts on patogenic bacteria isolated from milk of cows with mastitis. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.38, n.6, 2001.

PIPPI, B.; LANA, A.J.; MORAES, R.C.; GÜEZ, C.M.; MACHADO, M.; DE OLIVEIRA, L.F.; LINO VON POSER, G.; FUENTEFRIA, A.M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **J Appl Microbiol.**, v.118, n.4, p. 839-50, 2015.

PONTES, M.L.C.; VASCONCELOS, I.R.; DINIZ, M.F.F.M.; PESSÔA, H.L.F. Chemical characterization and pharmacological action of Brazilian red propolis. **Acta Bas**, v.2, n 1, p.34-38, 2018.

RANGEL, M.; MALPEZZI, E. L. A.; SUSINI, S. M. M.; FREITAS, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. **Toxicon**, v.35, 305-309, 1997.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p. 603- 613, 2001.

REGUEIRA NETO, M.S.; TINTINO, S.R.; SILVA, A.R.P.; COSTA, M.S.; BOLIGON, A.A.; MATIAS, E.F.F.; BALBINO, V.Q.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v.107, p. 572-580, 2017.

REILLY, C.; RASMUSSEN, K.; SELBERG, T.; STEVENS, J.; JONES, R.S. Biofilm community diversity after exposure to 0.4% stannous fluoride gels. **J Appl Microbiol**, v.117, 1798–1809, 2014.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutag ambl.** Canoas-RS: Ulbra, 2003.

RIGHI, A.A.; ALVES, T.R.; NEGRI, G.; MARQUES, L.M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J Sci Food Agric.**, v.91, n.13, p.2363-70, 2011.

ROBERTS, M.C. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. **Periodontol 2000**, v.28, p.280-297, 2002.

RÜFER, C.E.; KULLING, S. Antioxidant Activity of Isoflavones and Their Major Metabolites Using Different in Vitro Assays. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 2926 – 2931, 2006.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, p.549-557, 2004.

SAJJAN, P.; LAXMINARAYAN, N.; KAR, P.P.; SAJJANAR, M. Chlorhexidine as an Antimicrobial Agent in Dentistry – A Review. **OHDM**, v.15, n.2, 2016.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E..W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evid-Based Compl Altern Med**, v. 2, p.33–38, 2005.

SAMARANAYAKE, L.; MATSUBARA, V.H. Normal oral flora and the oral ecosystem. **Dent Clin North Am.**, v.61, p.199–215, 2017.

SANTOS, A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. **J Clin Periodontol**, v.30, p.13-16, 2003.

SANTOS, D.C.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Quim Nova**, v. 40, n. 2, p.171-175, 2017.

SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.C.S.; MARTINS, A.P.; JORGE, A.O.C. Prevalência e sensibilidade in vitro de -e *Pseudomonas* isoladas na cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. **PGRO Pós Grad Rev Odontol**, v.5, p.74 - 84. 2002.

SARDANA, D.; INDUSHEKAR, K.R.; MANCHANDA, S.; SARAF, B.G.; SHEORAN, N. Role of propolis in dentistry: review of the literature. **Focus on Altern and Complem Therap**, v.18, n.3, p. 118-125, 2013.

SCHELZ, Z.; MOLNAR, J.; HOHMANN, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. **Fitoterapia**, v.77, p.279-85, 2006.

SCHNEIDER, A.L.S.; BERTELLI, P.R.; BARRETO, M.L.; ABREU, N.V.; AGOSTINI, F.; SCHWAMBACH, J. Caracterização química e atividade biológica de extratos aquosos de *Brunfelsia cuneifolia* J.A. Schmidt (Solanaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.4, p.1103-1111, 2015.

SCHREIER, H.; GAGNÉ, L.; BOCK, T.; ERDOS, G. W.; DRUZGALA, P.; CONARY, J. T.; MULLER, B. W. Physicochemical properties and *in vitro* toxicity of cationic liposome cDNA complexes. **Pharm Acta Helvetiae**, v.72, p. 215-223, 1997.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v.5, n.3, p. 313-316, 2008.

SILVA, J.L.D.C.; SILVA, F.F.; SOUZA, T.F.M.; GENEROSO, W.G.; NORONHA, V.R.S.; PEREIRA, E.M.R.; DELUCA, M.P.; ABREU, S.L.R.; SANTOS, V.R. Synergic effect of associated green, red and brown Brazilian propolis extract onto *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. **Afr J of Pharm and Pharmacol**, v. 7, n. 29, p. 2006-2010, 2013.

SILVA, R.P.D.; MACHADO, B.A.S.; BARRETO, G.A.; COSTA, S.S.; ANDRADE, L.N.; AMARAL, R.G.; CARVALHO, A.A.; PADILHA, F.F.; BARBOSA, J.D.V.; UMSZA-GUEZ, M.A. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLoS One**, v. 12, n.3, 2017.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES, J.R.A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J Ethnopharm**, v.73, p.243-249, 2000.

SIMÕES, L.C.; LEMOS, M.; PEREIRA, A.M.; ABREU, A.C.; SAAVEDRA, M.J.; SIMÕES M. Persister cells in a biofilm treated with a biocide. **Biofouling**, v. 27, p. 403–411, 2011.

SIQUEIRA, A.B.; GOMES, B.S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; DE QUEIROZ, L.A.; PORTO, A.L. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Lett Appl Microbiol.**, v.48, n.1, 2009.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COUTELLEMONT, P.; SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicol In Vitro**, v.13, p.375–84, 1999.

THRALL M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**, 2 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2015.

TIVERON, A.P.; ROSALEN, P.L.; RANCHIN, M.; LACERDA, R.C.C.; BUENO-SILVA, B.; BENSO, B.; DENNY, C.; IKEGARI, M.; ALENCAR, S.M. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. **PLoS One**, v.11, n.11, 2016.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **eCAM**, v.3, p.249-254, 2006.

VAN GINKEL, G.; SEVANIAN, A. Lipid peroxidation induced membrane structural alterations. **Methods Enzymol**, v. 233, p.273–288, 1994.

VAN GRUNSVEN, M. F.; CARDOSO, E.B.T. Atendimento odontológico em crianças especiais. **Rev da APCD – Assoc Paul de Cirur-dent**, v.49, n.5, p.364-370, set./out. 1995.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUEBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v.59, p.1162–76, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím Nova**, v.28, p.519-28, 2005.

VILJOEN, A.; VUUREN, S.V.; ERNST, E.; LEPSER, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN WYK, B.E. *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) – the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **J Ethnopharm.** v.88, p.137-143, 2003.

VOLLMER, W.M.; PAPAS, A.S.; BADER, J.D.; MAUPOME, G.; GULLION, C.M.; HOLLIS, J.F. et al. Design of the Prevention of Adult Caries Study (PACS): a randomized clinical trial assessing the effect of a chlorhexidine dental coating for the prevention of adult caries. **BMC Oral Health**, v.10, 2010.

WANG, B.-J.; LIEN, Y.-H.; YU, Z.-R. Supercritical fluid extractive fractionation-study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chem**, v.86, p. 237-243, 2004.

WEFFORT-SANTOS, A.M.; ARBOS, K.A.; CLARO, L.M.; BORGES, L.; SANTOS, C.A.M. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nut Res**, v.28, p.457-463, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antim Resist: Global Report on Surveillance**; World Health Organization: Geneva, Switzerland. 2014.

WOJTYCZKA, R.D.; DZIEDZIC, A.; IDZIK D.; KEPA, M.; KUBINA R.; KABALA-DZIK A. et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. **Molecules**, v. 18, p. 9623-9640, 2013.

XIE, X.L.; GI, M.; FUJIOKA, M.; DOI, K.; YAMANO, S.; TACHIBANA, H. et al. Ethanol-extracted propolis enhances BBN-initiated urinary bladder carcinogenesis via non-mutagenic mechanisms in rats. **Food Chem Toxicol.**, v. 83, p.193–200, 2015.

YIXI, X.; YANG, W.; TANG, F.; CHEN, X.; REN, L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. **Cur Med Chem**, v.22, p. 132-149, 2015.

ZANATTA, F.B.; ROSING, C.K. Clorexidina: Mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific – A**., v.1, n.2, p.35-43, 2007.

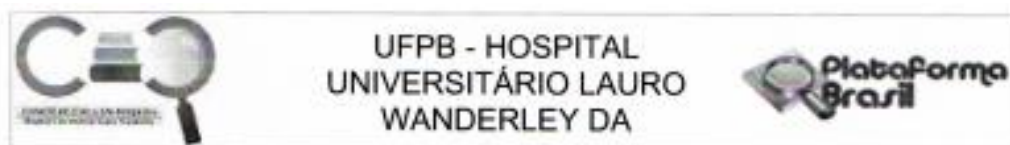
ZHANG, Y.; LEI, Y.; NOBBS, A.; KHAMMANIVONG, A.; HERZBERG, M.C. Inactivation of *S. gordinii* ssp. A Balers expression of multiple adhesin genes. **Infect Immun.**, v.73, p.3351-3357, 2005.



Anexos

ANEXOS

Certidão CEP HULW



Continuação do Parecer: 2.395.779

Outros	fichacadastro1.pdf	16/08/2017 21:09:25	MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTOfinal.pdf	16/08/2017 21:07:47	MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES	Aceito
Outros	solidipesnsaTCLE.pdf	16/08/2017 21:06:50	MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES	Aceito
Outros	cartacomissaofinal.pdf	16/08/2017 21:06:12	MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES	Aceito
Cronograma	CronogramaCEPfinal.docx	16/08/2017 21:05:31	MARCELA LINS CAVALCANTI DE PONTES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 20 de Setembro de 2017

Assinado por:

MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador)

Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPB
Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7954 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comite.etica@hulw.ufpb.br

Certidão CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS CERTIDÃO – 2º VIA

João Pessoa, 27 de março de 2017.

CEUA Nº 0310/13

Ilmo(a). Prof(a). Dr(a). Hilzeth de Luna Freire Pessoa
Departamento **Biologia Molecular** - CCEN - UFPB
Orientando(a): **Marcela Lins Cavalcanti de Melo**, (Doutorado)

Ref.: 2º Via da Certidão CEUA Nº 0310/13.

Conforme solicitado por vossa senhoria, estamos emitindo 2º via da certidão CEUA Nº 0310/13 aprovado em reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 01/11/2013 que **APROVOU** a execução do projeto **Efeito da própolis associada ao fluoreto de sódio e a clorexidina sobre a microbiota cariogênica; estudos in vitro e in vivo.**

Os demais dados da certidão original seguem inalterados. Caso algum animal já tenha sido utilizado, estes deverão ser descontados do montante relatado na certidão original.

Com previsão original de utilizar **9 Camundongos SWISS Fêmeas, 9 Camundongos SWISS Machos - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/11/2013 a 31/10/2017**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB