**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

Yamba Carla Lara Pereira

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO EFEITO DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS EM OSSO ALVEOLAR, COM E SEM CONTAMINAÇÃO
DE LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO**

Ribeirão Preto

2010

Yamba Carla Lara Pereira

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DO EFEITO DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS EM OSSO ALVEOLAR, COM E SEM CONTAMINAÇÃO
DE LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO**

Dissertação apresentada ao à Faculdade de Odontologia
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa
de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mamie Mizusaki Iyomasa

Ribeirão Preto

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Pereira, Yamba Carla Lara

Avaliação *in vivo* e *in vitro* do efeito do extrato de própolis em osso alveolar, com e sem contaminação de lipopolissacarídeo bacteriano/ Yamba Carla Lara Pereira; Orientadora: Mamie Mizusaki Iyomasa, Ribeirão Preto – 2010.

54 f. : l.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2010

Endotoxina, Lipopolissacarídeo (LPS), Própolis, reparo ósseo, ratos, exodontia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Yamba Carla Lara Pereira

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Epígrafe

“Façamos da humildade uma norma de conduta, da honestidade um princípio sagrado e da vontade de trabalhar uma filosofia de vida”

Autor desconhecido

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a **Deus**, Senhor e Provedor de cada dia desta minha caminhada;

Dedico de maneira especial aos meus pais **Edmilson** e **Célia**, incansáveis no apoio às minhas
escolhas;

Ao **Ulisses**, exemplo de amor, de honestidade e de companheirismo.

Ao meu avô **Antônio** e minha avó **Cidórcia**, pelo amor.

Aos meus tios **Osvaldo** e **Maria Aparecida**, pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. **Mamie Mizusaki Iyomasa** exemplar único de ser humano.

Por seus ensinamentos repletos de otimismo, religiosidade, calma e coerência.

A convivência foi a melhor parte desta caminhada!

Ao Prof. Dr. **Vinícius Pedrazzi** pelo carinho com que me direcionou dentro da FORP.

Um ser humano fantástico.

À **Regina Célia Otero dos Santos** pela oportunidade e pela confiança. Profissional séria e dedicada.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Aos professores que aceitaram fazer parte desta banca.

Ao Prof. Dr. **João Paulo Mardegan Issa** pelo exemplo de dinamismo e pelas oportunidades de crescimento.

À coordenação do Programa de Reabilitação Oral, na pessoa da Profa. Dra. Fernanda Panzeri pela seriedade e disponibilidade.

À minha amiga Samantha Baracchini por ter acreditado em mim mais que eu mesma.

À amiga e técnica Fabíola Mishima pelo imenso carinho a mim dedicado e pela contagem da grade.

À Prof^ª. Dra. Ana Maria de Oliveira pelo apoio e oportunidade.

Ao Prof. Dr. Evandro Watanabe pela ajuda imensurável na Concentração Inibitória Mínima.

À Ana Paula Farnesi por ter cedido a própolis verde utilizada neste trabalho.

Ao aluno João Paulo, da Farmacognosia, pelos procedimentos de Perfil Cromatográfico.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo pela cordialidade em nos ensinar os protocolos de Citotoxicidade.

Aos amigos de mestrado Bruno, Glauce, Maidy e Lilian pela parceria e pela alegria da convivência.

À Elisabete (“Betilene”) por toda ajuda e amizade.

Ao colega de laboratório Fernando José Dias e sua namorada Ana Paula Barbosa, pela ajuda diária e amizade.

Aos novos companheiros Ricardo Calzzani e Fernanda Fernandes pelo apoio aos novos projetos.

Aos alunos de Iniciação Científica: Camila, Kelly, Élen, Juliane, Mirela e Eduardo pela convivência.

À técnica Junia, por todo carinho, parceira e disponibilidade.

Aos técnicos: Gustavo, Paulo e Túlio pela cordialidade.

Aos professores que fizeram desta caminhada um instrumento de aprendizado, em especial Alma, Marilena e Iara.

Às secretárias da pós-graduação: Isabel Sola e Regiane Moi, pela ajuda constante.

À secretária do Programa de Pós Graduação em Reabilitação Oral: Regiane Tirado Damasceno, pela disponibilidade.

Aos amigos de Fortaleza (CE), Thiago, Fabíola, Helaine e Lia pelo incentivo.

Aos amigos de infância: Victor, Ellen, Ana Carolina, Alexandra e Diego, pelo apoio.

Aos amigos da Farmácia: Mayara, Vânia, Alisson, Bruno e Roberto pela ajuda e parceria.

Aos amigos de convívio pela ajuda, incentivo e exemplo: Carolina Assaf e seu esposo Rodrigo, Lilian, Angélica e Flávia, por todo respeito e consideração.

RESUMO

PEREIRA, Y.C.L. Avaliação *in vivo* e *in vitro* do efeito do extrato de própolis em osso alveolar, com e sem contaminação de lipopolissacarídeo bacteriano. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A própolis é uma substância resinosa, cujas atividades antibacteriana, antiinflamatória, antiviral, fungicida, imuno estimulante, cicatrizante e de anestésico local tem sido valorizadas no uso clínico. O lipopolissacarídeo (LPS) é reconhecidamente uma endotoxina e pode induzir processos inflamatórios. Os objetivos deste trabalho foram: a) analisar *in vitro* as seguintes propriedades do extrato de própolis verde: 1) perfil físico químico 2) Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à endotoxina da bactéria gram negativa *Escherichia coli*; e 3) sua atividade imunorregulatória sobre leucócitos de baço de ratos; b) analisar “*in vivo*” a ação do Extrato Etanólico de Própolis (EEP) 10% e 90% e do Extrato de Própolis Puro (EPP), em alvéolos dentais contaminados ou não com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Para o estudo *in vivo* 35 ratos foram submetidos às exodontias dos primeiros molares superiores direito e esquerdo, os quais, imediatamente tiveram o alvéolo dental direito contaminado com 0,1µL de lipopolissacarídeo (LPS) (100µg/kg) e o esquerdo sem tal contaminação. Os grupos com (n=7) para cada tratamento, após 2 semanas: GI- Controle Negativo (CN) - sem tratamento; GII- Tratados com Extrato de Própolis puro (EPP) GIII- Tratados com pasta de própolis a 90% (P90); GIV- Tratados com pasta de própolis a 10% (P10); e, GV- Tratado com veículo das pastas (SB) foram analisados. Os alvéolos foram removidos, desmineralizados, processados pela técnica histológica de rotina, submetidos a secções sistematizadas a 6 µm de espessura e corados em H.E. O volume de osso formado, foi avaliado por contagem de pontos, usando um Sistema Teste sobreposto as imagens capturadas com auxílio de uma câmera acoplada a um microscópio. Observada a normalidade dos dados, procedeu-se o teste ANOVA fatorial e Tukey-Kramer test ($p<0,05$). *In vitro* determinou-se a propriedade da própolis, sua CIM e atividade imunorregulatória. *In vivo* os alvéolos dentais contaminados com lipopolissacarídeo bacteriano e tratados com a própolis verde apresentou maior área de osso neoformado, quando comparado aos demais grupos experimentais. O alvéolo não contaminado e tratado com própolis pura mostrou maior área de fibras colágenas.

DESCRIPTORIOS: Endotoxina, Lipopolissacarídeo (LPS), Própolis, reparo ósseo, ratos, exodontia

ABSTRACT

PEREIRA, Y.C.L. *In vivo and in vitro effects of propolis extract on alveolar bone, with and without bacterial lipopolysaccharide contamination*. 2010. 54 f. Thesis (MA) - Faculty of Dentistry, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Propolis is a resinous substance, whose antibacterial, antiinflammatory, antiviral, antifungal, immune stimulant, and local anesthetic wound healing properties has been considered for clinical practice. The lipopolysaccharide (LPS) is recognized as an endotoxin and can induce inflammatory processes. Our objectives were: a) to analyze *in vitro* the following properties of green propolis extract: 1) physicochemical profile of green propolis sample, 2) Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against endotoxin from gram negative *Escherichia coli* and 3) its immunoregulatory activity using leukocytes from the spleen of mice,. b) analyze *in vivo*, the action of propolis ethanol extract (EEP) 10% and 90% and Pure Propolis Extract (EPP) in dental alveoli or not contaminated with lipopolysaccharide (LPS) bacterial. For *in vivo* study, 35 rats were subjected to extractions of maxillary first molars, right and left, which immediately had the right dental socket contaminated with 0.1 μ L of lipopolysaccharide (LPS) (100 μ g/kg) and left without such contamination. They were divided into groups (n = 7) for each sample after 2 weeks, according to the treatment in the right and left alveoli: GI-Negative Control (NC) - no treatment, GII-Treated Pure Propolis Extract (EPP) GIII-Treated folder with propolis 90% (P90), GIV-Treated folder with propolis 10% (P10) and GV-Treated folder with vehicle (SB). The alveoli were removed, demineralized, processed by routine histologic technique, submitted to systematic sections (6 microns) of thick and stained with HE for histological analysis to assess the new bone tissue volume by point counting method, using a Test system on images captured with the aid of a digital camera attached to a microscope. Observed data normality, we proceeded to ANOVA and Tukey-Kramer tests (p <0.05). *In vitro*, it was determined the propolis properties, CIM and immunoregulatory activity. *In vivo*, the alveoli contaminated with bacterian lipopolysaccharide and treated with green propolis induced higher bone formation when compared to other groups. The non contaminated alveoli and treated with pure propolis showed more quantity of collagen fibers.

KEYWORDS: Endotoxin, Lipopolysaccharide (LPS), Propolis, bone repair, rats, extraction

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	18
3 OBJETIVOS.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4 1 ESTUDOS IN VITRO.....	23
1 Determinação do Perfil químico da amostra de Própolis Verde.....	23
2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	23
3 Ensaio de atividade imunorregulatória sobre leucócitos de baço.....	24
4 2 ESTUDOS IN VIVO.....	25
1 Obtenção da Pasta a base de Extrato de própolis.....	25
2 Animais.....	26
2 1 Exodontias e Contaminação dos alvéolos com lipopolissacarídeo(LPS).....	27
2 2 Tratamento e Sutura dos tecidos.....	27
2 3 Sacrifício dos animais e perfusão.....	28
2 4 Obtenção das peças e Processamento Histológico.....	28
4 3 Análise qualitativa ao microscópio de luz.....	29
4 4 Análise quantitativa.....	29
4 5 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS.....	31
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÕES.....	46
8 REFERÊNCIAS.....	48

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância com características resinosas, cuja colheita advém de substâncias secretadas pelas plantas, é abundantemente encontrada nas colméias, sendo responsável pela impermeabilização, pelo vedamento e pela assepsia (Krol, Czuba *et al.*, 1990; Moț, Soponar *et al.*, 2010). Sua composição depende da região geográfica de onde foi extraído o substrato, da espécie de abelhas envolvidas, assim como os métodos de extração empregados (Banskota, Tezuka *et al.*, 2001). Seu uso data de 300 a.c. sendo bastante reconhecido seus efeitos antiinflamatório (El-Bassuony e Abouzid, 2010), antimicrobiano, anticâncer e antioxidante (Ahn, Kumazawa *et al.*, 2004; Ahn, Kunimasa *et al.*, 2009) e demonstrando atividades, antiviral, fungicida, imuno-estimulante e cicatrizante (Inokuchi, Shimazawa *et al.*, 2006; Kilicoglu, Kilicoglu *et al.*, 2008; Pontin, Da Silva Filho *et al.*, 2008; Fonseca, Marquele-Oliveira *et al.*, 2011). A solução etanólica de própolis a 10% assim como sua apresentação pura acelerou a cicatrização de feridas de pele (epitelização) (De Rezende, Da Costa *et al.*, 2008; Oliveira, Sakai *et al.*, 2008; Moura, Negri *et al.*, 2009; Valera, Da Rosa *et al.*, 2010). A própolis pode ser preparada em solução alcoólica ou hidroalcoólica, onde o etanol é o responsável pela extração dos componentes. Apresentando-se comercialmente como Extrato Etanólico de Própolis (EEP) em diversas concentrações ou como Extrato Puro de Própolis (EPP) (Farnesi, 2007). O solvente utilizado oferece influência na atividade antibacteriana da própolis (Drago, De Vecchi *et al.*, 2007). A literatura descreve também alguns episódios de repostas alérgicas frente aos derivados da própolis (Jensen e Andersen, 2006; Lee, Lee *et al.*, 2006).

O efeito antioxidante da própolis estudado na atualidade é atribuído aos flavonóides, como potentes na prevenção de danos celulares causados pelos radicais livres (Ahn, Kumazawa *et al.*, 2004; Ahn, Kunimasa *et al.*, 2009). Estudos mostram que a própolis age na enzima catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, nocivo às células (Isla, Nieva Moreno *et al.*, 2001). Além disso, Inokuchi, Shimazawa *et al.*, 2006 afirmaram que a própolis inibiu a neurotoxicidade e a apoptose de cultura células de retina (RGC 5) após a exposição destas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 24 horas.

A própolis foi utilizada na Odontologia como opção no controle da doença infecciosa mais comum nos países em desenvolvimento: a cárie dental, especialmente pela ação nos estreptococos do grupo *mutans* (Ikeno, Ikeno *et al.*, 1991; Sabir, Tabbu *et al.*, 2005; Libério,

Pereira *et al.*, 2009). A cárie dental é uma doença infecciosa que atinge todo o mundo, sendo considerado um problema de saúde pública. Algumas bactérias específicas estão ligadas ao desenvolvimento desse processo (Libério, Pereira *et al.*, 2009).

Em 2005, Sabbir e Tabu *et al.*, verificaram que o capeamento pulpar com própolis em dentes de rato submetidos ao capeamento pulpar com própolis, reduziu o processo inflamatório, principalmente quando utilizado o componente flavonóide isoladamente. A própolis foi ainda mais eficaz quando utilizada em outras áreas odontológicas, como a periodontia e a endodontia (Torres, Ramos *et al.*, 2001; Sabir, Tabbu *et al.*, 2005).

As bactérias são microorganismos que induzem reação inflamatória, seus produtos metabólitos, enzimas e toxinas são grandes causadores de doenças (Ferreira, Torres *et al.*, 2007). A forma das bactérias pode ser observada através de coloração de gram que as divide em dois grupos: gram positivas e gram negativas, aproximadamente iguais em número e importância. A reação das bactérias à coloração de gram expressa diferentes características no que diz respeito à composição química, estrutura, permeabilidade da parede celular, fisiologia, metabolismo e patogenicidade (Abou-Rass e Bogen, 1998; Chávez De Paz Villanueva, 2002; Ferreira, Torres *et al.*, 2007).

As células das bactérias gram positivas e gram negativas caracterizam-se por diferentes graus de virulência. As endotoxinas apresentam várias atividades nos organismos infectados e sua ação engloba ativação do sistema complemento, linfócitos B, granulócitos e células mononucleares, apresentando com isso ação imuno-estimulante (Marcucci, Ferreres *et al.*, 2001; Tanomaru Filho, Leonardo *et al.*, 2002; Soares, Leonardo *et al.*, 2005; Tanomaru-Filho, Polisel-Neto *et al.*, 2005). As bactérias gram negativas, por possuírem em sua composição uma endotoxina, o lipopolissacarídeo (LPS), tem como propriedade principal a patogenicidade (Seixas, Garrido *et al.*, 2002; Rocha, Silva *et al.*, 2009), podendo levar a severos processos inflamatórios (Hojlo, 2007). O maior efeito do lipopolissacarídeo (LPS) está associado à produção de alguns mediadores, como as citocinas, prostaglandinas e o próprio Óxido Nítrico (Li, Khansari *et al.*, 2002), onde a injeção de altas doses de LPS inclui neutropenia, hipotensão, produção de citocinas e pode ser letal (Passos, Fernandes *et al.*, 2004). Baseados nessa ação sobre o osso promovida pelo lipopolissacarídeo (LPS), alguns autores sugerem a injeção local deste lipopolissacarídeo para fins benéficos, onde este possa promover osteólises de massas ósseas heterotróficas (Ting, Ramachandran *et al.*, 1999; Ting e Freund, 2004).

A reabsorção óssea pode ser associada a doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide, a osteomielite, artrite bacteriana ou periodontites (Girasole, Passeri *et al.*, 1994). Desta forma, afirma-se que as endotoxinas de bactérias vivas ou mortas, íntegras ou em fragmentos, atuam sobre os macrófagos, os neutrófilos e fibroblastos, desencadeando a liberação de vários mediadores químicos inflamatórios bioativos ou citocinas (Passos, Fernandes *et al.*, 2004).

Li, Khansari *et al.*, 2002 fundamentaram que, em altas doses de lipopolissacarídeos (LPS), estes induzem a reabsorção óssea, sendo esta mediada, pelo menos em parte, pela interleucina 1 (IL-1) e o pelo fator de necrose tumoral (TNF), mas isso não se repete em baixas doses de LPS. É sabido que as endotoxinas, presentes nos canais e periápices contaminados por bactérias gram negativas, alteram as propriedades de estimulação de anticorpos do hospedeiro (Li, Khansari *et al.*, 2002; Leonardo, Salgado *et al.*, 2003; Tanomaru, Leonardo *et al.*, 2003; Leonardo, Hernandez *et al.*, 2006).

Além disso, este lipopolissacarídeo adere-se de forma irreversível aos tecidos reabsorvíveis como o osso e cimento, perpetuando a reação inflamatória local, (Seixas, Garrido *et al.*, 2002; Tanomaru, Leonardo *et al.*, 2003; Leonardo, Hernandez *et al.*, 2006).

Vários tratamentos têm sido propostos visando uma regeneração guiada de tecidos ósseos, utilizando diversas combinações de enxertias ósseas. Condutas que implicam no sucesso e no custo do tratamento odontológico (Gottlow, Nyman e Karring, 1984; Gottlow, Nyman, Karring *et al.*, 1984; Karring, Nyman *et al.*, 1993; Karring, 2000; Sculean, Stavropoulos *et al.*, 2004).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA:

As atividades antiinflamatórias apontam para o potencial da própolis como opção ao uso clínico, especialmente na forma de medicamentos naturais (Silva, Almeida *et al.*, 2004). Atualmente, o uso de produtos naturais como tratamento alternativo e para prevenção de doenças tem aumentado, fato este que justifica o estudo da diversidade apresentada pela flora e pela fauna (Koo, Gomes *et al.*, 2000; Ferreira, Torres *et al.*, 2007; Ang, Pavlos *et al.*, 2009). Baseado em suas propriedades antiinflamatórias e antibióticas a própolis verde foi estudada com o propósito de ser uma opção como medicação tópica nos casos de superfícies ósseas contaminadas com endotoxinas bacterianas.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS:

A própolis é uma substância resinosa, cujas atividades antibacteriana, antiinflamatória, antiviral, fungicida, imuno-estimulante, cicatrizante e de anestésico local tem sido valorizadas no uso clínico. O lipopolissacarídeo (LPS) é reconhecidamente uma endotoxina e pode induzir processos inflamatórios. Os objetivos deste trabalho foram:

- a) analisar *in vitro* as seguintes propriedades do extrato da própolis verde:
 - a.1) o perfil físico químico da amostra de própolis verde (HPLC).
 - a.2) a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato estudado frente à bactéria gram-negativa *Escherichia coli*; e
 - a.3) sua atividade imunorregulatória sobre leucócitos de baço (citotoxicidade).

- b) analisar *in vivo* a ação do Extrato de Própolis Puro (EPP) e do Extrato Etanólico de Própolis (EEP) 10% e 90%, em alvéolos dentais contaminados ou não com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

ESTUDOS *IN VITRO*

1 Determinação do Perfil químico da amostra de Própolis Verde

A análise da composição físico-química da amostra, com a colaboração do professor Dr. Jairo Kenupp Bastos, do laboratório de Farmacognosia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP seguiu o protocolo desenvolvido e validado para este fim (De Sousa, Da Silva Filho *et al.*, 2009). Os reagentes e os solventes utilizados foram de grau analítico, sendo que para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência foram empregados solventes de grau cromatográfico e a água. Todos os solventes e soluções empregados como fases móveis em cromatografia líquida de alta eficiência foram filtrados em membrana de nitrato de celulose. A identificação foi realizada comparando-se o tempo de retenção lambda máximo e a razão das áreas de picos em 280 e 320 nm (A 280/320), em cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se três condições diferentes: a) fase estacionária coluna C-18 (CLC-ODS) e como fase móvel gradiente multi-linear; b) fase estacionária coluna C-18 (CLC-ODS) e como fase móvel sistema isocrático com 25% de solução tampão pH 4,0 (93,9% água + 0,8 % de ácido acético + 0,3% de acetato de amônio + 5% de MeOH) e 75% de acetonitrila, fluxo de 1,5 mL/min); c) fase estacionária a coluna CN e como fase móvel sistema isocrático com 25% de solução tampão pH 4,0 (93,9% água + 0,8 % de ácido acético + 0,3% de acetato de amônio + 5% de MeOH) e 75% de acetonitrila, fluxo de 1,5 mL/min.

2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi desenvolvida na Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto (USP), com a colaboração do Prof. Dr. Evandro Watanabe e supervisão da Prof^a. Denise de Andrade. Para isso, a *Escherichia coli* foi replicada em tubos de ensaio contendo TSB incubada em estufa a 37°C por 24 horas. Utilizando uma alça de platina esterilizada, o microrganismo indicador foi transferido para tubo contendo 5 mL de solução salina, padronizada comparativamente com tubo (0,5) metade da escala de MacFarlan (0,05 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,95 mL de ácido sulfúrico a 1,0%).

Diluições sucessivas foram realizadas até obtenção de um inóculo de 107 células/mL. A suspensão obtida foi adicionada ao meio Muller Hinton na proporção de 2%, obtendo-se o inóculo. Foi utilizada esta mesma amostra de própolis (Verde), com as seguintes concentrações: 400,00; 399,0; 398,00; 397,0; 396,0; 395,0; 394,0; 395,0; 394,0 e 393,0 ug / mL.

3. Ensaio de atividade imunorregulatória sobre leucócitos de baço

O estudo *in vitro* da ação imunorregulatória dos extratos foi desenvolvido em colaboração com o professor Dr Auro Nomizo do Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP (USP), seguindo o seguinte protocolo:

a) Meio de Cultura Celular

Foi utilizado o meio RPMI 1640 com 02 tipos de suplementos distintos. Para a manutenção e realização de ensaios com as populações celulares o meio RPMI 1640 foi suplementado com 100U/ml penicilina G, 100 µg/ml estreptomicina, 02 mM L-glutamina, 1,0 mM piruvato de sódio e 7,5% soro bovino fetal [RPMI-C]. Para a preparação (obtenção e/ou lavagens) das linhagens experimentais o meio RPMI 1640 foi suplementado apenas com 100U/mL penicilina G e 100 µg/ml estreptomicina [RPMI] (todos os reagentes foram adquiridos da GIBCO-Invitrogen, SP, Brasil).

b) Obtenção de Células Esplênicas de Ratos

Os ratos previamente submetidos à eutanásia pela instilação de CO₂ tiveram o baço removido cirurgicamente, o qual foi triturado usando peneira de aço inox (0,01mm porosidade) em placa de *Petri* contendo 2-4 mL de meio RPMI. O meio de cultura das placas contendo células esplênicas (livre de debris celulares/tissulares) foram coletadas em tubos de plástico e lavadas por 02 vezes a 1000 rpm/ 15 min/ 10°C, re-suspendidas em meio RPMI-C, contadas e utilizadas para fins experimentais.

c) Avaliação da atividade Proliferativa / citotóxica da Própolis em células esplênicas de ratos

O efeito citotóxico e a atividade moduladora do extrato na proliferação de células esplênicas foram avaliados pelo método colorimétrico do MTT: 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium. Previamente, esplenócitos de rato foram preparados no dia do experimento e plaqueados na concentração de $0,5 \times 10^5$ células/0,2 ml/poço/ placas de 96 poços- fundo chato (TPP, Trasadingen, Switzerland).

Os esplenócitos em cultura foram incubados: a) somente na presença de meio, b) em diferentes concentrações de Própolis, c) de álcool a 1% (solvente) e d) em droga controle, metotrexato (Ensaio de citotoxicidade). Os Ensaios de atividade proliferativa foram feitos por 24 horas, em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. Após o período de incubação, foram adicionados aos poços de cultivo celular 10 µL de MTT (5mg/mL), e mantidos por mais 4 horas em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida foram acrescentados aos poços 50 µL de solução a 20% de dodecil sulfato de sódio/HCL 0,01N. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A atividade proliferativa/citotóxica foi medida em espectrofotômetro, utilizando filtro de interferência de $\lambda_{\text{max}}=570$ nm.

ESTUDOS *IN VIVO*

1. Obtenção da Pasta a base de Extrato de própolis

A própolis escolhida para servir de substrato a este trabalho foi a Própolis Verde, coletada em janeiro de 2005, na cidade de Capetinga (MG). A escolha da Própolis Verde foi determinada, tanto por sua facilidade de manuseio quanto pela característica antiinflamatória preponderante (Farnesi, 2007).

A obtenção dos princípios ativos primários da própolis foi realizada com uso de 30 g de própolis pulverizada em 100 mL de álcool 70%, à temperatura ambiente, sendo macerada por 48 horas e agitada seis vezes ao dia (Farnesi, 2007). A separação do extrato de própolis dos resíduos foi por decantação, precedida de uma filtração a vácuo, em seguida levado ao Rotaevaporador a 115 rpm e 80° C. Uma vez transferido para um

vidro âmbar permaneceu na estufa a 45° C por 07 dias, visando eliminar a água, finalmente esse vidro foi tampado hermeticamente e armazenado à temperatura ambiente.

Para obtenção da pasta propriamente dita, o extrato apurado foi diluído a uma concentração hidroalcoólica de 10% e misturado a um veículo viscoso inerte: a sílica coloidal (Pedrazzi, 1996). Este mesmo veículo foi homogeneizado ao Extrato Puro da Própolis visando à obtenção da segunda pasta, a uma concentração de 90%. Esta fase foi executada pelos técnicos José Orestes Del Ciampo e Mário Sadaiti Ogasawara, sob supervisão da Prof^a. Marilisia Guimarães Lara, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP (USP).

2. Animais

Foram selecionados 35 animais machos do tipo *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia* da linhagem *Wistar* com peso corporal variando entre 200 e 250 gramas, idade aproximada de 50 dias, que receberam alimentação e água *ad libitum*. Foram divididos em grupos com (n=7) cada para análise após 2 semanas (tabela 1), de acordo com o tratamento nos alvéolos direito e esquerdo: GI- Controle Negativo (CN) - sem tratamento; GII- Tratados com Própolis puro (EPP) GIII- Tratados com pasta de própolis a 90% (P90); GIV- Tratados com pasta de própolis a 10% (P10); e, GV- Tratado com veículo das pastas (SB). Eles foram alojados em caixas com 4 animais cada, com livre acesso a água e alimento, em temperatura controlada (23 ±1°C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

Este projeto foi submetido ao Conselho de Ética em Pesquisa no Uso de Animais Experimentais do Campus USP de Ribeirão Preto, obtendo aprovação sob número 091.1.1558.55.5.

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
2 Semanas	sem tratamento	EPP	P90	P10	SB
Número de Animais	7	7	7	7	7

Tabela 1 - Grupos experimentais relacionando número de animais ao tempo de tratamento.

2.1. Exodontias e Contaminação dos alvéolos com lipopolissacarídeo (LPS):

Os animais foram anestesiados com Xilasina 10 mg/Kg e Cetamina 80 mg/Kg peso corporal e submetidos às exodontias dos primeiros molares superiores direito e esquerdo com auxílio de “Hollemback” e pinça anatômica, após sindesmotomia prévia. Imediatamente após as exodontias, os animais tiveram os alvéolos direito contaminados com 0,1 µL de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), a uma concentração de 100 µg/kg, oriunda da parede celular da *Escherichia coli* (Sigma, St.Louis,MO,USA) (Li, Khansari *et al.*, 2002), enquanto que os alvéolos esquerdos não foram contaminados. Esta contaminação foi realizada por meio de uma seringa milimetrada de Hamilton® (89502 Hamilton Company, Nevada, USA) acoplada a um tubo de polietileno, visando evitar a contaminação do instrumento. Para este procedimento, o *eppendorf* contendo a endotoxina permaneceu sob constante agitação, para minimizar a aderência da endotoxina às paredes do tubo.

Figura 01: Seringa Hamilton de 10 µl, acoplada em cânula de polietileno, propiciando a contaminação dos alvéolos dentais de ratos Wistar sem contaminação da seringa.

2.2. Tratamento e Sutura dos tecidos

Imediatamente após as exodontias seguidas de contaminação ou não, cada grupo de animais teve seus alvéolos preenchidos com as seguintes substâncias: EPP, EEP a 90%, EEP a 10%, Substância Branca (SB) ou, sem preenchimento, respectivamente.

Nesses animais apenas o alvéolo do primeiro molar direito foi contaminado. A medicação tópica foi inserida até o completo preenchimento do alvéolo, seguida de sutura com fio de seda 6.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a fechar devidamente as margens do rebordo.

2.3. Sacrifício dos animais e perfusão:

Após o período pré-determinado de 2 semanas do tratamento, os animais foram sacrificados após anestesia com Xilasina 10 mg/Kg e Cetamina 80 mg/Kg peso corporal seguida de rompimento do diafragma. Imediatamente receberam injeção intracardíaca de 0,1 µL de heparina (Hepamax 5000 U.I./ml, solução injetável IV/SC, Blausiegel) e submetidos à perfusão intracardíaca com 50 ml de formol tamponado a 10% (formaldeído 10%) dissolvido em solução de PB a 0,1M, pH 7,4 por um período de 15 minutos, para promover a fixação dos tecidos. O sistema de perfusão é constituído de uma bomba de infusão 540 T2 – SAMTRONIC, com controle do tempo e velocidade de infusão da solução a ser administrada. O sucesso da perfusão foi percebido pelo tremor muscular causado pela reação do fixador com proteínas das células, deixando o animal rígido.

2.4. Obtenção das peças e Processamento Histológico

A cabeça foi dissecada até a exposição da maxila, e usando um Motor Elétrico (Multicler Cirúrgico, Dentscler, São Bernardo do Campo- SP, Brasil) os alvéolos direito e esquerdo foram removidos, sob irrigação constante, com auxílio de disco diamantado inserido à caneta reta. Os alvéolos foram imersos na mesma solução fixadora usada na perfusão, por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA a 0,5M, trocando-se as soluções semanalmente, por um período que variou de 15 a 30 dias. Para o processamento histológico de rotina os alvéolos foram desidratados em uma série crescente de álcoois, diafanizados em xilol e, incluídos em parafina. De cada amostra foram realizados cortes sistematizados de 6µm de espessura (no sentido transversal às raízes) de apical para a cervical. Esses cortes foram corados por hematoxilina-eosina e observados em microscópio de luz Leica MZ12₅ (Leica Microsystem, Alemanha)

Figura 02: Desenho esquemático da maxila removida e da posição de inclusão em parafina.

3 Análise qualitativa ao microscópio de luz

A análise qualitativa das lâminas permitiu avaliar a área de osso neoformado no alvéolo bem como comparar essa neoformação entre os diferentes grupos experimentais. Foram capturadas imagens no aumento de 100X utilizando um microscópio de luz Leica MZ12₅ (Leica Microsystem, Alemanha) acoplado a uma câmera digital.

4 Análise quantitativa

A análise da área de osso neoformado no alvéolo de cada animal foi feita pelo Método de Contagem Diferencial de Pontos, onde um sistema-teste de 108 pontos foi sobreposto aos campos previamente capturados (7). A área relativa de osso neoformado (Vv), em alvéolos após a exodontia, foi determinada pela relação entre os pontos que estivessem sobre tecido ósseo neoformado (Pp) e o total de pontos da grade teste (Pt), sendo representada pela seguinte fórmula: $Vv = Pp/Pt (\%)$.

Figura 03: Imagem de osso alveolar corado em HE, capturada em aumento de 100x, submetida ao programa IMAGE J, com grade de 108 pontos sobreposta para contagem dos pontos em osso neoformado.

A área relativa de fibras colágenas em relação à área total capturada foi determinada com o auxílio do Software Image J analisando-se lâminas previamente coradas em *Picro Sirius*.

Figura 04: Imagem de osso alveolar corado em Coloração de *Picro Sirius*, capturada em aumento de 100x (A), submetida ao programa IMAGE J (B) e identificada Fração de Área em porcentagem (C).

5 Análise estatística

Observada a normalidade dos dados, procedeu-se o teste ANOVA fatorial, com dois fatores de variação fixos (tratamentos e uso de endotoxina) e Tukey-Kramer test ($p < 0,05$).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 IN VITRO

a) Determinação do Perfil químico da amostra de Própolis Verde

O controle de qualidade e a padronização da amostra de própolis verde foram realizados pelo método validado por (Souza, De Souza *et al.*, 2007; De Sousa, Da Silva Filho *et al.*, 2009), cuja técnica cromatográfica foi disponibilizada pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP (USP). Seguem os dados referentes a esta amostra de própolis verde:

Gráfico 02: Perfil Cromatográfico por método HPLC, da amostra de própolis verde estudada, com caracterização das seguintes substâncias: 1-ácido cafeico, 2-ácido cumárico, 3-ácido ferúlico, 4-ácido cianico, 5- AME, 6-Drupanin, 7- Isosacuretin, 8- Artepellin C, 9- Baccharin ,10- DCBE, 11- IS e 12- SS

A partir do conhecimento do perfil cromatográfico desta amostra de própolis foi possível caracterizar como preponderantes os componentes: Ácido Cafeico (1), Ácido Cumárico (2), Drupanin (6) e Isosacuretin (7).

b) Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Este estudo envolve subprodutos tóxicos de bactérias, portanto, a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a amostra estudada fez-se necessária. A CIM pode ser definida como a menor concentração de um agente antibiótico capaz de inibir o crescimento de um microorganismo. À concentração de 400ug/ml a própolis verde inativou a *Escherichia coli* (ATCC 25922).

c) Ensaio de atividade imunorregulatória sobre leucócitos de baço

O efeito citotóxico e a atividade moduladora na proliferação de células esplênicas frente ao extrato de própolis verde foram avaliados, como descrito na metodologia, pelo método colorimétrico do MTT (3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium). A partir da concentração inicial 1000 µg/µl (A), foi obtida uma segunda solução à concentração de 500µg/µl (B). A pasta de própolis a 10% (P10), o Extrato de Própolis Puro, o álcool absoluto (solvente inicial da amostra de própolis) e o veículo das pastas (SB) serviram de soluto. As amostras foram testadas em triplicata, nas concentrações de 500, 100, 10 e 1 µg/µl nos poços. Os dados coletados e repetidos compuseram a tabela a seguir:

Drogas Testadas		DO em Triplicata		
*****		DO1	DO2	DO3
E P P	500	0.23	0.028	0.204
	100	0.015	0.197	0.22
	10	0.039	0.049	0.019
	1	0.077	0.02	0
S B	500	1.028	1.159	1.094
	100	0.178	0.207	0.196
	10	0.013	0.018	0.02
	1	0.038	0.042	0.019
P I 0	500	0.69	0.935	0.856
	100	0.308	0.279	0.277
	10	0.197	0.02	0.065
	1	0.048	0.049	0.037
O H	500	0.035	0.052	0.06
	100	0.045	0.049	0.042
	10	0.021	-0.017	0.029
	1	0.037	-0.015	0.041

Tabela 02- Os dados obtidos em triplicatas (DO 1, 2 e 3) pelo método ELISA, que visa avaliar o efeito citotóxico das seguintes substâncias: EPP, SB, P10 e álcool absoluto (OH) nas concentrações de 500, 100, 10 e 1 µg/µl.

Gráfico 03: Análise estatística dos dados obtidos do ensaio de atividade imunorregulatória em leucócitos de ratos (tabela 02), onde foram avaliadas as substâncias: Extrato de Própolis Puro, Substância Branca, Pasta de Própolis a 10% e Álcool, todos nas concentrações de 500, 100, 10 e 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

A análise estatística dos dados, através do programa livre PRISMA 3.0 com nível de significância $p < 0,05$, apontou que as amostras celulares colocadas nas triplicatas e submetidas ao tratamento com a substância branca (SB) e Pasta de Própolis a 10% (P10) nas concentrações de 500 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, apresentaram efeito citotóxicos maiores quando comparados ao grupo controle (meio + célula) e os demais grupos estudados.

As demais amostras de própolis, especialmente na forma pura, apresentaram resultados compatíveis de imunorregulação em células esplênicas de ratos.

6.2 IN VIVO

a) Achados clínicos

Todos os animais apresentaram boa recuperação após o procedimento anestésico-cirúrgico, sem complicações pós-operatórias, não havendo perda de animais.

b) Análise qualitativa

A análise histológica dos alvéolos corados em Hematoxilina-Eosina (figura 5), contaminados ou não com LPS, revelou amplas cavidades medulares, contendo osso neoformado com aspecto imaturo e numerosas células, tanto no controle negativo correspondente ao alvéolo contaminado (A) assim como o não contaminado (B).

O grupo de animais que teve os alvéolos contaminados e tratados com extrato de própolis puro (C) revelou um osso mais organizado e maduro, enquanto o lado não contaminado e submetido ao mesmo tratamento (D) revelou alvéolos com amplas cavidades medulares, preenchidas por um tecido conjuntivo muito celular.

Quando os alvéolos foram tratados com pasta de própolis à 90%, tanto o grupo contaminado (E) quanto o não contaminado (F) apresentaram histologicamente o osso neoformado intercalado por amplas cavidades medulares. O grupo tratado com pasta a 10% (G e H) ou com substância branca (I e J) apresentaram características histológicas semelhantes às descritas no grupo tratado com pasta à 90% (E e F).

c) Análise quantitativa

c.1 Contagem de Osso

O grupo cujos alvéolos foram contaminados com endotoxina e tratados com extrato de própolis pura (EEP D) mostrou área significativamente maior de formação óssea, em relação aos demais grupos experimentais. Quando comparadas as áreas de osso neoformado com os demais grupos expostos e não expostos ao LPS, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos; CN D (controle negativo direito – com endotoxina) e CN E (controle negativo esquerdo – sem endotoxina) e entre os demais grupos tratados com: P10 E (Pasta de Própolis a 10% Esquerdo – sem endotoxina), P10 D (Pasta de Própolis a 10% Direito – com endotoxina), P90 D e P90 E (Pasta de Própolis a 90% Direito e Esquerdo – com e sem endotoxina) e SB D e SB E (substância branca- veículo das pastas).

Gráfico 04: Área relativa de osso neoformado em alvéolos dentais contaminados (direito - D) ou não (esquerdo - E) com lipopolissacarídeo bacteriano. Grupos Controle Negativo (CN), Extrato de Própolis Puro (EPP), Pasta de Própolis a 90% (P90), Pasta de Própolis a 10 % (P10) e Substância Branca (SB), usada como veículo das pastas. Obtido através do programa Prisma 3.0.

Figura 05: Fotomicrografias coradas em Hematoxilina-Eosina (100 x): A e B: Controle Negativo; C e D: Extrato de Própolis Puro; E e F: Pasta de Própolis 90%; G e H: Pasta de Própolis 10% e I e J: Substância Branca.

c.2 Contagem de Fibras Colágenas

Grupos

Gráfico 05- Área relativa de fibras colágenas em alvéolos dentais contaminados (direito - D) ou não (esquerdo - E) com lipopolissacarídeo bacteriano. Grupos Controle Negativo (CN), Extrato de Própolis Puro (EPP), Pasta de Própolis a 90% (P90), Pasta de Própolis a 10 % (P10) e Substância Branca (SB), usada como veículo das pastas, obtido através do programa Prisma 3.0.

O gráfico 05 mostra a área relativa de fibras colágenas em alvéolos dentais, contaminados (direito) ou não (esquerdo) com lipopolissacarídeo bacteriano, 14 dias após o tratamento. O alvéolo do grupo que teve ausência de contaminação e foi tratado com Extrato de Própolis Puro (EPP E), apresentou uma maior área de fibras colágenas em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos CN D e CN E (alvéolos sem tratamento).

Gráfico 06: Análise dos tratamentos do lado direito (contaminado), que isoladamente, apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$), havendo menor formação de fibras colágenas nos grupos tratados (EEP D, P90 D, P10 D e SB D) que quando comparados ao grupo controle (CN D).

Quando avaliada a área de fibras colágenas apenas no grupo com o alvéolo contaminado por LPS (gráfico 06), seguida de seus respectivos tratamentos, o grupo Controle Negativo apresentou resultado estatisticamente relevante ($p < 0,05$), no qual houve maior área de fibra colágena, em relação aos grupos tratados (EPP, P10 E P90) e o controle positivo (SB - veículo).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

A própolis possui enorme importância medicinal e econômica, sendo comercializada em várias preparações farmacêuticas e cosméticas, tais como: comprimidos, pastilhas, dentifrícios, loções, cremes faciais, tinturas, pomadas, etc. (Park, Koo *et al.*, 1998; Bankova, Popova *et al.*, 2002; Christov, Trusheva *et al.*, 2005; Popova, Chen *et al.*, 2010). Tem sido observado um aumento significativo do interesse da população pelo produto, do número de criadores de abelhas que investe na melhoria da produção da própolis e de empresas processadoras deste material (Salomão, Pereira *et al.*, 2008).

Segundo Pileggi, Antony *et al.*, 2009 a identificação dos diversos tipos, cores, constituições e composições químicas das própolis produzidas é necessária, devido à variação de acordo com a origem do material coletado. A amostra de própolis verde utilizada em nosso experimento revelou maior quantidade de ácido cafeico (1), ácido cumárico (2), drupanin (6) e isosacuretin (7) seguindo o método HPLC (Souza, De Souza *et al.*, 2007). Apesar de Bankova, Popova *et al.*, 2002 atribuírem os efeitos biológicos benéficos da própolis verde (*Baccharis dracunculifolia*) aos altos níveis de ácido cumárico, drupanin e artepelin C., artepillin C e baccharin, foram identificados em nossa amostra (Gráfico 02: 8 e 9) em menores proporções. Apesar de Moura, Negri *et al.*, 2009 relatarem a presença do ácido fenólico na composição de algumas amostras de própolis, este componente não foi identificado na amostra estudada.

O CAPE (Caffeic acid phenethyl Ester) é um éster antioxidante derivado da própolis, com potente e específico efeito inibidor na ativação do NF- κ B e do NFAT (Lee, Kuo *et al.*, 2003; Márquez, Sancho *et al.*, 2004; Ang, Pavlos *et al.*, 2009; Zych, Folwarczna *et al.*, 2010), e conseqüente supressão da osteoclastogênese, por interferência no fator de diferenciação do osteoclasto (RANKL) (Ha, Choi *et al.*, 2009; Pileggi, Antony *et al.*, 2009). Além disso, é citado na literatura que o CAPE é um agente antitumoral, que age nos citocromos p75 (NTR) das células de gliomas (Liao, Hsu *et al.*, 2010).

Em nossos resultados, a CIM da amostra de própolis verde capaz de inibir a bactéria gram negativa *Escherichia coli* foi 400ug/ml, enquanto (Farnesi, 2007) descreveu a concentração de 396 ug/mL como sendo a CIM para a mesma amostra de própolis verde. Sugere-se que o tempo desde a coleta influencia nas propriedades antibacterianas da própolis. Estudos de Onlen, Duran *et al.*, 2007 determinaram que

frente à bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*, a concentração inibitória mínima de 1024 µg/ml foi necessária, para que própolis atingisse o efeito antibacteriano na proteção de mucosa nasal de coelhos (Onlen, Duran *et al.*, 2007).

A viabilidade dos produtos ou substâncias naturais é descrita na literatura, com detalhamento de técnicas para quantificação de células, visando demonstrar a compatibilidade destes produtos ao uso clínico. Para isso podem ser utilizadas, por exemplo, culturas de células (Martin e Pileggi, 2004) ou testes de citotoxicidade (Sá-Nunes, Faccioli *et al.*, 2003). Por meio da atividade imunorregulatória da própolis em células esplênicas de ratos, os dados de citotoxicidade das amostras celulares, colocadas em triplicatas, demonstraram que a própolis na forma pura, ou seja, sem associação ao veículo, foi compatível com o uso experimental, por sua característica imunorreguladora e não citotóxica. Esses dados corroboram com os publicados por Moura, Negri *et al.*, 2009, onde amostras de própolis em forma de esponjas de poliéster-poliuretano inseridas subcutaneamente revelaram biocompatibilidade e capacidade desse produto natural aumentar o número de células e a formação de colágeno nos grupos experimentais estudados. No entanto, Jensen e Andersen, 2006 e Lee, Kim *et al.*, 2006, descreveram respostas alérgicas do organismo frente à exposição aos derivados da própolis.

Por meio da atividade imunorregulatória em células esplênicas de rato, a substância branca pura (SB), usada como veículo, e a própolis à 10% (P10), em forma de pasta, associada ao veículo (SB), nas maiores concentrações (500 µg/µl), apresentaram efeitos citotóxicos importantes, quando comparados ao grupo controle (meio + célula) e aos demais grupos estudados,. No entanto, quando esse veículo (SB) e a pasta de própolis, contendo maiores concentrações desse veículo, foram analisadas em modelo experimental *in vivo* não revelaram problemas de biocompatibilidade. Desta forma, sugere-se que a presença de uma quantidade maior do veículo (sílica coloidal) tenha interferido no método de leitura e apuração dos resultados de citotoxicidade, medidos em espectrofotômetro (utilizando filtro de interferência de $\lambda_{max}=570$ nm), dificultando a passagem da luz nos poços, e não na citotoxicidade.

O modelo experimental *in vivo* deste trabalho foi realizado em alvéolo dental de ratos submetidos à exodontia bilateral dos primeiros molares superiores, contaminados ou não com LPS e tratados ou não. A análise da área relativa de osso neoformado foi realizada 14 dias após a exodontia nesses alvéolos. A literatura revela que as superfícies ósseas expostas ao lipopolissacarídeo induzem sinais de transdução ativando os

receptores 4 (TLR4) (Watanabe, Tanomaru *et al.*, 2008; Tomomatsu, Aoki *et al.*, 2009; Watanabe, Iizuka *et al.*, 2010), possibilitando a perpetuação da resposta inflamatória (Ha, Choi *et al.*, 2009; Burke, Cunningham *et al.*, 2010). Segundo Fokkema, Loos *et al.*, 2002; Miyauchi, Kitagawa *et al.*, 2004; Vardar, Buduneli *et al.*, 2005 os lipopolissacarídeos em superfícies ósseas estimulam a cascata do ácido aracdônico, via metabolismo das cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), causando várias doenças. Essas toxinas quando livres podem induzir também a liberação de três diferentes tipos de mediadores das bacteremias: proteínas, radicais livres e lipídios (Tanomaru, Leonardo *et al.*, 2003; Hojlo, 2007). Em modelo experimental usando a calvária de camundongos, o LPS administrado por via subcutânea, tanto em altas quanto em baixas concentrações, induziu a reabsorção óssea (Fokkema, Loos *et al.*, 2002; Li, Khansari *et al.*, 2002; Miyauchi, Kitagawa *et al.*, 2004; Vardar, Buduneli *et al.*, 2005). Caso o modelo experimental produzido fosse o defeito ósseo crítico em calvária de ratos (Abdala, Iyomasa *et al.*, 2010; Issa, Defino *et al.*, 2010), haveria grande risco de contaminação do encéfalo do animal com o LPS, comprometendo seus sinais vitais e a viabilidade da pesquisa.

Tais fatores foram determinantes para a escolha do alvéolo dental como modelo experimental deste estudo sobre o efeito da própolis em osso contaminado por LPS. Estudos afirmam que em 16 semanas após a injúria há uma expressiva formação de osso em defeitos ósseos de calvária, e que estes índices máximos de neoformação óssea são vistos a partir da 4ª semana (Levi, James *et al.*, 2010). Baseado nisso, o período experimental proposto neste trabalho procurou analisar, em alvéolos dentais, a fase intermediária de desenvolvimento ósseo.

A análise histológica revelou, após 14 dias, uma área maior de osso neoformado no grupo de animais cujo alvéolo dental foi contaminado com LPS (direito), e recebeu o tratamento com extrato de própolis puro (EPP-D). Segundo Secreto *et al.*, 2009, a reparação de fratura e a regeneração óssea requerem a reativação localizada da cascata sinalizadora, que são importantes para o desenvolvimento do esqueleto. O processo de reparo é primário quando ocorre a formação direta do osso e secundário quando ocorre a formação de osso por ossificação endocondral (Yamagiwa e Endo, 2009). No reparo ósseo primário é fundamental o contato com a cortical óssea adjacente, e requer o recrutamento de células osteoprogenitoras, osteoclastos e células mesenquimais indiferenciadas para o sítio da fratura (Han, Sung *et al.*, 2002; Secreto, Hoepfner *et al.*, 2009). As características histológicas revelaram que o processo de reparo em nosso

experimento ocorreu de forma direta, desde que não foram evidenciados grupos de células cartilaginosas. Clarke, 2008 afirmou que o osso se desenvolve por um processo equilibrado de reabsorção e aposição de osso, com participação direta do grupo de osteoclastos e osteoblastos, respectivamente. Acrescentou que a maturação da matriz óssea está associada à expressão de fosfatase alcalina e várias proteínas não colagenosas, incluindo osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. O cálcio e as proteínas de ligação de fosfato regulam a deposição ordenada de minerais, a quantidade e o tamanho dos cristais de hidroxiapatita formados. Martin e Pileggi, 2004 e Ha et al 2009 revelaram que o ácido cafeico (CAPE), presente na própolis, suprime a osteoclastogênese em cultura de células derivadas da medula óssea, agindo no fator de diferenciação do osteoclasto (RankL). Desta forma, a área maior de osso no grupo tratado com própolis sugere que a ação dos osteoblastos na formação da matriz óssea foi favorecida, mediante a inibição da atividade dos osteoclastos. No entanto mais estudos são requeridos em relação à própolis e osso, visto que Zych et al., 2010 relataram que o ácido cafeico prejudica a propriedade mecânica do osso em ratas.

Com relação à análise da área de fibras colágenas, o grupo nos quais os alvéolos foram contaminados com endotoxina e tratados em seguida, apresentou uma área menor de fibras colágenas, independente do tratamento realizado, quando comparado ao grupo controle (CN- D). Os osteoblastos ativos sintetizam o colágeno tipo I e outras proteínas da matriz na direção do osso em formação (Clarke, 2008). Burke et al., 2010 verificaram que o LPS aumenta a atividade do NF κ B e aumenta a contração do colágeno em cultura de células de fibroblastos de intestino humano. Sugere-se que a menor área de fibras colágenas encontrada nos alvéolos dentais contaminados esteja relacionada a essa contração das fibras induzidas pelo LPS. A matriz óssea contém componentes orgânicos, representados em sua maioria por fibras colágenas, e por componentes inorgânicos que se distribuem ao longo dessas fibras (Kierszenbaum, 2008). No entanto, no tempo experimental deste estudo (14 dias) notou-se uma área maior de osso neoformado apenas no grupo contaminado com LPS e tratado com EPP. Há necessidade, portanto, de uma pesquisa temporal, para verificar se no final do desenvolvimento, a formação óssea tende ao equilíbrio entre a área de osso e colágeno.

No grupo de animais que tiveram os alvéolos apenas tratados com própolis pura e que não foram contaminados com LPS, houve significativa formação de fibras colágenas em relação aos demais tratamentos. Kilicoglu, Kilicoglu et al., 2008, afirmaram que em casos de anastomose do cólon tratados com própolis houve melhor

resultado em relação à proliferação, ativação e capacidade de síntese dos fibroblastos, quando comparados ao grupo controle. Dados estes que corroboram aos obtidos por este estudo, onde houve uma área maior de fibras colágenas identificadas nos alvéolos não contaminados.

Neste trabalho, a escolha da aplicação da própolis em forma de pasta vislumbrava o uso clínico, cujo custo-benefício fosse compatível com as necessidades comerciais. Em geral, a própolis é composta por 50% de bálsamo (incluindo fenólicos) e resina, 30% água, 10 % pólen e 10% de essência de óleos (Sobocanec, Sverko *et al.*, 2006), um material de difícil aplicação, mas com grande aderência por suas características resinosas. Baseados em estudos publicados por Fonseca, Marquede-Oliveira *et al.*, 2011, o extrato de própolis utilizado a uma concentração de 14% foi capaz de exercer os efeitos antioxidantes e antiinflamatórios em pele de camundongos *hairless*. Em concentrações maiores (90%), a própolis diluída em veículo alcoólico, reduziu a ação viral do herpes genital em cultura de células (Nolkemper, Reichling *et al.*, 2010). Dados estes que justificam a escolha das pastas de própolis nas concentrações de 10% e 90% utilizadas neste estudo.

O veículo escolhido para compor as pastas de própolis estudadas foi a sílica coloidal, um material cujas partículas foram sintetizadas historicamente a partir de um processo sol-gel e foram modificados com 3-methacryloxypropyltrimethoxysilano (g-MPS) para induzir grupos vinil na superfície destas partículas. (Zheng, Zhou *et al.*, 2010). Poovarodom e Berg em 2010 compararam as atividades de mobilidade e eletroforese de dois tipos de sílicas: com e sem tratamento superficial, utilizando hexadeciltrimethoxysilane. Afirmaram que a adição de grupos hidroxilas proporciona potencial ácido-base extra, resultando no aumento da mobilidade das partículas, sendo este o motivo de escolha deste veículo. Novos testes poderão ser realizados, utilizando outros tipos de veículos para a composição das pastas, já que, no presente estudo, a sílica coloidal interferiu de forma significativa na leitura e apuração dos resultados em espectrofotômetro.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

A partir dos dados coletados neste modelo experimental podemos concluir:

a) Por meio do estudo *in vitro* que:

a1) Os componentes preponderantes nesta amostra de própolis verde obtidos pelo método HPLC foram: Àcido Cafeico (1), Ácido Cumárico (2), Drupanin (6) e Isosacuretin (7);

a2) A Concentração Inibitória Mínima capaz de inativar a *Escherichia coli* para esta amostra de própolis verde foi de 400 µg/ml.

a3) A própolis pura estudada apresentou boas propriedades imunorregulatórias sobre leucócitos de baço.

b) Por meio do estudo *in vivo*, que após 14 dias do tratamento:

b1) Os alvéolos dentais contaminados com LPS e tratados com própolis verde pura apresentaram maior área de neoformação óssea;

b2) Aos 14 dias da exodontia e da aplicação dos tratamentos o grupo Extrato de Própolis Puro (EPP E) apresentou maior área de formação de fibras colágenas quando comparado aos demais tratamentos.

Outros estudos poderão ser realizados visando compreender o mecanismo biológico da ação da própolis verde, seu uso clínico, assim como o custo-benefício compatível às necessidades comerciais.

REFERÊNCIAS

9-REFERÊNCIAS

- ABDALA, P. *et al.* Osteoinductivity potential of rhBMP-2 associated with two carriers in different dosages. *Anat Sci Int* [S.I.], Mar 2010.
- ABOU-RASS, M.; BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 39-47, Jan 1998.
- AHN, M. *et al.* Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem* [S.I.], v. 52, n. 24, p. 7286-92, Dec 2004.
- _____. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res* [S.I.], v. 53, n. 5, p. 643-51, May 2009.
- ANG, E. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF-kappaB and NFAT activity. *J Cell Physiol* [S.I.], v. 221, n. 3, p. 642-9, Dec 2009.
- BANKOVA, V. *et al.* Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch C* [S.I.], v. 57, n. 5-6, p. 530-3, 2002 May-Jun 2002.
- BANSKOTA, A. *et al.* Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* [S.I.], v. 15, n. 7, p. 561-71, Nov 2001.
- BURKE, J. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide promotes profibrotic activation of intestinal fibroblasts. *Br J Surg* [S.I.], v. 97, n. 7, p. 1126-34, Jul 2010.
- CHRISTOV, R. *et al.* Chemical composition of propolis from Canada, its antiradical activity and plant origin. *Nat Prod Res* [S.I.], v. 19, n. 7, p. 673-8, Oct 2005.
- CHÁVEZ DE PAZ VILLANUEVA, L. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [S.I.], v. 93, n. 2, p. 179-83, Feb 2002.
- CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* [S.I.], v. 3 Suppl 3, p. S131-9, Nov 2008.
- DE REZENDE, G. *et al.* In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. *Braz Dent J* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 301-5, 2008.
- DE SOUSA, J. *et al.* A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. *Phytochem Anal* [S.I.], v. 20, n. 1, p. 24-32, Jan 2009.
- DRAGO, L. *et al.* In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). *J Appl Microbiol* [S.I.], v. 103, n. 5, p. 1914-21, Nov 2007.
- EL-BASSUONY, A.; ABOUZID, S. A new prenylated flavanoid with antibacterial activity from propolis collected in Egypt. *Nat Prod Commun* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 43-5, Jan 2010.

FARNESI, A. P. *Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos*. (2007). 2007.

FERREIRA, F. *et al.* Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [S.I.], v. 104, n. 5, p. 709-16, Nov 2007.

FOKKEMA, S. *et al.* A type 2 response in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell cultures from periodontitis patients. *Clin Exp Immunol* [S.I.], v. 127, n. 2, p. 374-8, Feb 2002.

FONSECA, Y. *et al.* Evaluation of the Potential of Brazilian Propolis against UV-Induced Oxidative Stress. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], v. 2011, 2011.

GIRASOLE, G. *et al.* Interleukin-11: a new cytokine critical for osteoclast development. *J Clin Invest* [S.I.], v. 93, n. 4, p. 1516-24, Apr 1994.

GOTTLOW, J. *et al.* Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone and gingival connective tissue. *J Periodontal Res* [S.I.], v. 19, n. 2, p. 214-220, Mar 1984.

_____. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* [S.I.], v. 11, n. 8, p. 494-503, Sep 1984.

HA, J. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester inhibits osteoclastogenesis by suppressing NF kappaB and downregulating NFATc1 and c-Fos. *Int Immunopharmacol* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 774-80, Jun 2009.

HAN, S. *et al.* Activation of murine macrophage cell line RAW 264.7 by Korean propolis. *Arch Pharm Res* [S.I.], v. 25, n. 6, p. 895-902, Dec 2002.

HOJLO, M. M., HUGOWSKI, C, SZYMANIEC, S., SPLAWSKA, K.A. *Experimental uveitis induced by different uniform salts of enterobacterial lipopolysaccharides*. *Postepy Hig Med Dosw.* [S.I.], v. 61, p. 606-611, 2007.

IKENO, K. *et al.* Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* [S.I.], v. 25, n. 5, p. 347-51, 1991.

INOKUCHI, Y. *et al.* Brazilian green propolis protects against retinal damage in vitro and in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], v. 3, n. 1, p. 71-7, Mar 2006.

ISLA, M. *et al.* Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 76, n. 2, p. 165-70, Jul 2001.

ISSA, J. *et al.* Evaluation of rhBMP-2 and natural latex as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. *Anat Rec (Hoboken)* [S.I.], v. 293, n. 5, p. 794-801, May 2010.

JENSEN, C.; ANDERSEN, K. Allergic contact dermatitis from cera alba (purified propolis) in a lip balm and candy. *Contact Dermatitis* [S.I.], v. 55, n. 5, p. 312-3, Nov 2006.

KARRING, T. Regenerative periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol* [S.I.], v. 2, n. 4, p. 101-9, Oct 2000.

KARRING, T. *et al.* Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontol 2000* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 26-35, Feb 1993.

KIERSZENBAUM, A. *HISTOLOGIA E BIOLOGIA CELULAR*. 2008.

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

KOO, H. *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* [S.I.], v. 45, n. 2, p. 141-8, Feb 2000.

KROL, W. *et al.* Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem Int* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 593-7, 1990.

LEE, S. *et al.* Autosensitization dermatitis associated with propolis-induced allergic contact dermatitis. *J Drugs Dermatol* [S.I.], v. 5, n. 5, p. 458-60, May 2006.

LEE, Y. *et al.* Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 66, n. 12, p. 2281-9, Dec 2003.

LEONARDO, M. *et al.* Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [S.I.], v. 102, n. 5, p. 680-5, Nov 2006.

_____. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 69-74, 2003 Jan-Mar 2003.

LEVI, B. *et al.* Human Adipose-Derived Stromal Cells Stimulate Autogenous Skeletal Repair via Paracrine Hedgehog Signaling with Calvarial Osteoblasts. *Stem Cells Dev* [S.I.], Oct 2010.

LI, L. *et al.* Contribution of interleukin-11 and prostaglandin(s) in lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. *Infect Immun* [S.I.], v. 70, n. 7, p. 3915-22, Jul 2002.

LIAO, Y. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester suppresses the induction of eotaxin in human lung fibroblast cells. *J Asthma* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 233-7, Apr 2010.

LIBÉRIO, S. *et al.* The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 125, n. 1, p. 1-9, Aug 2009.

MARCUCCI, M. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 74, n. 2, p. 105-12, Feb 2001.

MARTIN, M.; PILEGGI, R. A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 85-9, Apr 2004.

MIYAUCHI, M. *et al.* Immunolocalization of CXC chemokine and recruitment of polymorphonuclear leukocytes in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol* [S.I.], v. 121, n. 4, p. 291-7, Apr 2004.

MOURA, S. *et al.* Aqueous Extract of Brazilian Green Propolis: Primary Components, Evaluation of Inflammation and Wound Healing by Using Subcutaneous Implanted Sponges. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], Aug 2009.

MOT, A. *et al.* Multivariate analysis of reflectance spectra from propolis: geographical variation in Romanian samples. *Talanta* [S.I.], v. 81, n. 3, p. 1010-5, May 2010.

MÁRQUEZ, N. *et al.* Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther* [S.I.], v. 308, n. 3, p. 993-1001, Mar 2004.

NOLKEMPER, S. *et al.* Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine* [S.I.], v. 17, n. 2, p. 132-8, Feb 2010.

OLIVEIRA, T. *et al.* Mineral trioxide aggregate as an alternative treatment for intruded permanent teeth with root resorption and incomplete apex formation. *Dent Traumatol* [S.I.], v. 24, n. 5, p. 565-8, Oct 2008.

ONLEN, Y. *et al.* Antibacterial activity of propolis against MRSA and synergism with topical mupirocin. *J Altern Complement Med* [S.I.], v. 13, n. 7, p. 713-8, Sep 2007.

PARK, Y. *et al.* Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol* [S.I.], v. 36, n. 1, p. 24-8, Jan 1998.

PASSOS, G. *et al.* Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol* [S.I.], v. 172, n. 3, p. 1839-47, Feb 2004.

PEDRAZZI, V. *A presença de sílica espessante e sílica abrasiva em formulações básicas de dentifrícios - alguns aspectos físico-químicos e biológicos.* (1996). 1996.

PILEGGI, R. *et al.* Propolis inhibits osteoclast maturation. *Dent Traumatol* [S.I.], v. 25, n. 6, p. 584-8, Dec 2009.

PONTIN, K. *et al.* In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* [S.I.], v. 103, n. 3, p. 487-92, Aug 2008.

POPOVA, M. *et al.* A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in pacific propolis from Taiwan. *Phytochem Anal* [S.I.], v. 21, n. 2, p. 186-91, Mar 2010.

ROCHA, R. *et al.* Nitric oxide detection in cell culture exposed to LPS after Er:YAG laser irradiation. *Int Endod J* [S.I.], v. 42, n. 11, p. 992-6, Nov 2009.

SABIR, A. *et al.* Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 135-8, Sep 2005.

SALOMÃO, K. *et al.* Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Evid Based Complement Alternat Med* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 317-324, Sep 2008.

SCULEAN, A. *et al.* Healing of human intrabony defects following regenerative periodontal therapy with a bovine-derived xenograft and guided tissue regeneration. *Clin Oral Investig* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 70-4, Jun 2004.

SECRETO, F. J. *et al.* Wnt signaling during fracture repair. *Curr Osteoporos Rep* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 64-9, Jul 2009.

SEIXAS, F. *et al.* Clinical aspects of pulpal-periodontal lesions. *Aust Endod J* [S.I.], v. 28, n. 2, p. 82-5, Aug 2002.

SILVA, F. *et al.* Natural medicaments in endodontics -- a comparative study of the anti-inflammatory action. *Braz Oral Res* [S.I.], v. 18, n. 2, p. 174-9, 2004 Apr-Jun 2004.

SOARES, J. *et al.* Effect of biomechanical preparation and calcium hydroxide pastes on the antisepsis of root canal systems in dogs. *J Appl Oral Sci* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 93-100, Mar 2005.

SOBOCANEC, S. *et al.* Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *J Agric Food Chem* [S.I.], v. 54, n. 21, p. 8018-26, Oct 2006.

SOUZA, R. *et al.* Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and characterization of bioactive components of two Brazilian propolis samples using a pKa-guided fractionation. *Z Naturforsch C* [S.I.], v. 62, n. 11-12, p. 801-7, 2007 Nov-Dec 2007.

SÁ-NUNES, A. *et al.* Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. *J Ethnopharmacol* [S.I.], v. 87, n. 1, p. 93-7, Jul 2003.

TANOMARU FILHO, M. *et al.* Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod* [S.I.], v. 28, n. 4, p. 295-9, Apr 2002.

TANOMARU, J. *et al.* Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* [S.I.], v. 36, n. 11, p. 733-9, Nov 2003.

TANOMARU-FILHO, M. *et al.* Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. *Int Endod J* [S.I.], v. 38, n. 7, p. 477-82, Jul 2005.

TING, A.; FREUND, J. Nonsteroidal antiinflammatory-induced acute renal failure detected on bone scintigraphy. *Clin Nucl Med* [S.I.], v. 29, n. 5, p. 318-9, May 2004.

TING, K. *et al.* A short isoform of Col9a1 supports alveolar bone repair. *Am J Pathol* [S.I.], v. 155, n. 6, p. 1993-9, Dec 1999.

TOMOMATSU, N. *et al.* LPS-induced inhibition of osteogenesis is TNF-alpha dependent in a murine tooth extraction model. *J Bone Miner Res* [S.I.], v. 24, n. 10, p. 1770-81, Oct 2009.

TORRES, M. *et al.* Salivary Streptococcus mutans and Lactobacillus sp levels in cardiac children. *J Clin Pediatr Dent* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 103-9, 2001.

VALERA, M. *et al.* Action of propolis and medications against Escherichia coli and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [S.I.], v. 110, n. 4, p. e70-4, Oct 2010.

VARDAR, S. *et al.* Individual and combined effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* [S.I.], v. 76, n. 1, p. 99-106, Jan 2005.

WATANABE, E. *et al.* Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride-based mouthwashes against Staphylococcus aureus: an in vitro study. *J Appl Oral Sci* [S.I.], v. 16, n. 4, p. 275-9, 2008 Jul-Aug 2008.

WATANABE, K. *et al.* Involvement of toll-like receptor 4 in alveolar bone loss and glucose homeostasis in experimental periodontitis. *J Periodontal Res* [S.I.], Sep 2010.

YAMAGIWA, H.; ENDO, N. [Bone fracture and the healing mechanisms. Histological aspect of fracture healing. Primary and secondary healing]. *Clin Calcium* [S.I.], v. 19, n. 5, p. 627-33, May 2009.

ZHENG, J. *et al.* Silica hybrid particles with nanometre polymer shells and their influence on the toughening of polypropylene. *Nanoscale* [S.I.], v. 2, n. 10, p. 2269-74, Sep 2010.

ZYCH, M. *et al.* Administration of caffeic acid worsened bone mechanical properties in female rats. *Planta Med* [S.I.], v. 76, n. 5, p. 407-11, Mar 2010.