

AValiação DA TOXICIDADE DE UMA Solução DE PRÓPOLIS MARROM EM LINHAGENS CELULARES RENais FELINAS E CANINAS

MEDEIROS, Daiana Maciel; FÁCCIO, Cacciane; FINGER, Paula Fonseca; LUZ, Patrícia Gaspar da; HÜBNER, Silvia Oliveira.

Laboratório de Virologia e Imunologia (Labvir) – Facvet/UFPeI
daianamaciemedeiros@yahoo.com.br

1 - INTRODUÇÃO

A procura por substâncias naturais dotadas de propriedades biológicas tem se intensificado nas últimas décadas. Dentre os compostos naturais caracterizados por possuírem atividades farmacológicas, a própolis, cuja aplicação terapêutica é conhecida e utilizada desde os primórdios da civilização, é alvo, atualmente, de inúmeras investigações científicas, tendo por objetivo identificar os mecanismos de sua bioatividade.

Por definição, própolis é um produto resinoso natural produzido pelas abelhas melíferas a partir de substâncias coletadas em diferentes partes das plantas, como brotos, casca, botões florais e exsudatos resinosos (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). As propriedades terapêuticas da própolis estão relacionadas à ação bactericida (ORSI et al., 2000), antiviral (BURDOCK, 1998; FISCHER *et al.*, 2005), anti-inflamatória (ANSORGE *et al.*, 2003), antioxidante (SCHELLER *et al.*, 1989), anticarcinogênica (ORSOLIC et al. 2004), e imunomoduladora (FISCHER et al., 2007a, b). Embora empregada como produto medicinal desde os tempos mais remotos, a compreensão exata da sua constituição química é relativamente recente e inclui mais de 300 substâncias, já identificadas em sua composição, na qual predominam os polifenóis (DE CASTRO, 2001; CASTALDO; CAPASSO, 2002). A maioria dos polifenóis são flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos e cetonas, os quais são responsáveis pela ação contra vários micro-organismos patogênicos (BANSKOTA *et al.*, 1998; BURDOCK, 1998). Outros componentes da própolis incluem óleos voláteis, ácidos aromáticos, ceras, resinas, bálsamos e grãos de pólen, ricos em elementos essenciais como magnésio, níquel, cálcio, ferro e zinco (DOBROWOLSKI et al., 1991).

No presente estudo, analisou-se a concentração máxima não tóxica de um extrato de própolis marrom com predominância de Artepillin C (ácido hidroxicinâmico) frente a linhagens celulares renais de felinos e caninos.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

A solução de própolis marrom utilizada foi fornecida por Apis Nativa Produtos Naturais Indústria e Comércio Ltda. O extrato aquoso liofilizado foi reconstituído em meio Eagle (DMEM, Sigma) numa concentração final de 5%. Pelo método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), sua constituição química foi previamente analisada e estabelecida.

Tabela 1: Compostos químicos identificados no extrato de própolis marrom.

Nome	tR(min)	Concentração mg/g
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 1)	11,05	3,099365719
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (derivado 2)	20,06	0,315947012
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	28,92	1,327367459
Ácido cinâmico (derivado 1)	31,82	0,312398406
2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	21,71	0,320307701
Ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano	32,52	0,477792323
Total (mg/g)		5,853178619

A avaliação *in vitro* da toxicidade da própolis foi realizada em cultura de células renais denominadas *Crandel feline kidney cells* (CRFK) e *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK). Monocamadas de células foram cultivadas em microplacas com 96 cavidades, contendo Meio Essencial Mínimo (MEM), acrescido de Soro Fetal bovino 10%, antifúngicos e antibióticos. Após incubação a 37°C em estufa úmida com 5% de CO₂ durante 48 horas, foram adicionados MEM contendo diluições seriadas em base 2 da solução de própolis a 5%. Análises da toxicidade, mediante a visualização direta por microscopia óptica ou através do ensaio de vermelho neutro, o qual determina a viabilidade celular, foram realizadas depois de 48 horas de incubação com as diferentes concentrações do extrato. Para o ensaio, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se uma solução de vermelho neutro a 0,033% por 2 horas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Procedeu-se, então, a remoção do meio contendo o corante e, após lavagem das células com MEM, foram adicionados 100µl/cavidade de uma solução contendo 50% (v/v) etanol e 1%(v/v) de ácido acético para solubilização. A placa foi devidamente agitada por 10 min, e a leitura das densidades ópticas foi medida num espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm. Foi calculada a porcentagem de células viáveis mediante a fórmula $AT/AC \times 100$, sendo AT e AC a absorbância dos tratados e a absorbância dos controles, respectivamente.

3 - RESULTADO E DISCUSSÕES

Na visualização direta por microscopia óptica, evidenciou-se ausência de alterações celulares na concentração de 125 µg/ml de própolis marrom em células CRFK e em células MDCK.

Os resultados obtidos, mediante o ensaio com vermelho neutro realizado neste estudo, demonstraram uma viabilidade celular de 93% para a linhagem CRFK, quando utilizado 125 µg/mL do extrato de própolis marrom, enquanto que para a linhagem MDCK, a viabilidade apresentada foi de 100% nessa mesma concentração. A própolis marrom a 250 µg/ml em MDCK resultou em 85% de viabilidade.

Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* vêm comprovando a baixa toxicidade dos constituintes do extrato de própolis. A concentração máxima não tóxica encontrada neste experimento está de acordo com um estudo realizado por

BRUM (2006), no qual se encontrou a concentração de 120µg/mL para a linhagem MDCK.

4 - CONCLUSÃO

A mensuração da maior concentração de própolis marrom incapaz de apresentar toxicidade às linhagens analisadas foi de 125 µg/ml para as células CRFK e MDCK. O conhecimento da concentração tóxica da própolis às células é de extrema relevância, pois garantirá maior segurança nos estudos envolvendo a sua aplicação terapêutica.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSORGE, S.; REINHOLD, D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- α 1 production of human immune cells. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.58, p.580-589, 2003.

BANSKOTA, A. H.; et al. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **Journal of Natural Products**. v.61. p.896-900. 1998.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

BRUM, Larissa. **Atividade Antiviral dos Compostos Fenólicos (Ácido Ferúlico e Transcinâmico) e dos Flavonóides (Quercetina e Kaempherol) sobre os Herpesvirus Bovino 1, Herpesvirus Bovino 5 e Cinomose Canina. 2006. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa , 23 de novembro de 2006.**

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**. v.73, Supplement 1. p.S1-S6. 2002.

DE CASTRO SL. Propolis: biological and pharmacological activities. **Therapeutic uses of this bee-product. Ann. Rev. Biomed. Sci.**, 2001, 2, 49-83.

DOBROWOLSKI JW, VOHORA SB, KALPANA S, SHAH SA, NAQVI SAH, Dandiya PC 1991. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on própolis bee products. **Journal of Ethnopharmacol** 35: 77–82.

FISCHER, G.; DUMMER, L.A.; VIDOR, T.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S. Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos. In: **ENCONTRO DE PÓSGRADUAÇÃO**, 7., 2005, Pelotas, RS. Anais. Pelotas, 2005.

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

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, n.2, p.205-219, 2000.

SCHELLER, S.; OWCZAREK, S.; KROL, W.; MALINOWSKA, B.; NIKODEMOWICS, E.; ALEKSANDROWICZ, J. Immunisierungsversuche bei zwei fallen von alveolitis fibroticans bei abnehmender leistungsfähigkeit des immunsystems unter anwendung von propolis-athanolextrakt (EEP), esberitox N und eines calcium-magnesium-preparates (dolomit.). **Heilkunst**, v.102, p.249-255, 1989.

ORSOLIC, N.; KNEZEVI, A.H.; SVER, L.; TERZI, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.307-315, 2004.