

JULIANA MARQUES SENEDESE

*AValiação da POSSÍVEL MUTAGENICIDADE DO EXTRATO DE PRÓPOLIS
BRASILEIRA EM FORMULAÇÕES TÓPICAS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS IN
VIVO E IN VITRO*

*Dissertação apresentada à
Universidade de Franca, como
exigência parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.*

*Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Crispim
Tavares*

FRANCA

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA MARQUES SENEDESE

***AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL MUTAGENICIDADE DO EXTRATO DE PRÓPOLIS
BRASILEIRA EM FORMULAÇÕES TÓPICAS EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS IN
VIVO E IN VITRO***

Presidente: _____

Nome:

Instituição:

Titular 1: _____

Nome:

Instituição:

Titular 2 _____

Nome:

Instituição:

Franca, _____ / _____ / _____

Dedico

Aos meus pais, ao meu noivo, meus irmãos, a minha orientadora Denise e aos amigos de laboratório que sempre me ajudaram nos momentos que precisei durante estes dois anos de trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Senhor Criador de tudo, que sempre me conduz, me ampara, me fortalece e me abençoa.

À minha orientadora, a professora Denise Crispim Tavares, modelo para mim de seriedade e compromisso, agradeço a dedicação e confiança dispensados a mim. A delicadeza e amizade com que sempre me tratou, foi fundamental para seguir o caminho almejado.

Aos meu amados pais, Eduardo e Maria de Lourdes, agradeço pelo amor dedicado, pelo apoio que sempre me deram, pela confiança e por todo o sacrifício realizado para que fosse possível a concretização de mais um sonho.

Agradeço aos meus irmãos Andréa, Selma e Marcelo pelo incentivo que sempre me deram.

Minhas amigas de laboratório: Viviane, Michele, Jaqueline, Carla e Flávia; agradeço pelo companheirismo que sempre tivemos e pela amizade que tanto prezo.

Ao meu amor, Juliano Alves Dias, agradeço por ser sempre presente e amigo, por me incentivar a superar as dificuldades e lutar por mais esta conquista.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro das seguintes instituições:

Apis Flora Industrial e Comercial Ltda.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Fapesp

Universidade de Franca

RESUMO

SENEDESE, Juliana Marques. *Avaliação da possível mutagenicidade do extrato de própolis brasileira em formulações tópicas em células de mamíferos in vivo e in vitro*. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Franca, Franca.

A própolis é uma substância resinosa, que possui coloração e consistência relacionada à flora visitada pelas abelhas. A própolis é elaborada a partir de resinas vegetais e exudatos e transportada para dentro da colméia onde as abelhas adicionam secreções próprias. A própolis é utilizada desde a antiguidade apresentando uma ampla atividade biológica, como antioxidante, antibiótica, anticâncer, antiinflamatória, dentre outras. O presente estudo avaliou o potencial genotóxico de formulações tópicas suplementadas com extrato de própolis (1,2; 2,4 e 3,6%) para o tratamento de queimados, produzidas pela Apis Flora Industrial e Comercial Ltda; utilizando como parâmetros a análise de micronúcleos em sangue periférico de ratos Wistar e análise de aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster Chinês. Nos ensaios *in vivo*, os animais foram lesados dorsalmente e então submetidos ao tratamento subagudo e subcrônico que consistiam no tratamento diário com aplicações dérmicas dos géis contendo diferentes concentrações de própolis. Nos estudos *in vitro*, tratamentos em pulso de 3 horas (fase G1 do ciclo celular) e contínuo (20 horas) foram realizados. Nenhuma diferença estatisticamente significativa na frequência de micronúcleos foi observada entre os animais tratados com os géis contendo diferentes concentrações de própolis e o controle negativo para os dois tempos de tratamento. Frequências semelhantes de aberrações cromossômicas foram observadas nas culturas tratadas em pulso de 3 horas e continuamente com os géis contendo diferentes concentrações de própolis em relação às culturas não submetidas a qualquer tratamento. Entretanto, no tratamento contínuo as culturas tratadas com o gel 3,6% de própolis apresentaram índices mitóticos significativamente menores quando comparados ao grupo controle negativo. Sob condições do presente estudo, as formulações tópicas contendo diferentes concentrações de própolis usadas para o tratamento de queimadura não apresentaram efeito clastogênico nos sistemas-teste utilizados, mas o gel 3,6 de própolis apresentou efeito citotóxico no sistema-teste *in vitro* para o tratamento contínuo.

Palavras-chave: própolis, micronúcleo; aberrações cromossômicas.

ABSTRACT

SENEDESE, Juliana Marques. *Assessment of the mutagenicity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells in vitro and in vivo*. 2007. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de Franca, Franca.

Propolis is a resinous substance with coloring and consistence related to flowers visited by bees. Propolis is produced from vegetal resins taken into the hives where bees add their own secretions to it. Propolis usage dates back ancient times, with a wide biological activity, such as antioxidant, antibiotic, anticancer, antiinflammatory, among others. The present study evaluated the genotoxic potential of topical formulations supplemented with propolis extract (1.2, 2.4 and 3.6%) for the treatment of burns produced by Apis Flora Industrial e Comercial Ltda., having as a parameter the analysis of micronuclei in peripheral blood Wistar rats and analysis of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary cells and. In the *in vivo* assessment, the animals were injured on the back and then submitted to subacute (7 days) and subchronic (30 days) treatments consisting of daily dermal applications of gels containing different concentrations of propolis. In the *in vitro* studies, 3-h pulse (G_1 phase of the cell cycle) and continuous (20 h) treatments were performed. No statistically significant differences in the frequencies of micronuclei were observed between animals treated with gels containing different concentrations of propolis and the negative control for the two treatment times. Similar frequencies of chromosome aberrations were observed for cultures submitted to 3-h pulse and continuous treatment with gels containing different propolis concentrations and cultures not submitted to any treatment. However, in the continuous treatment cultures treated with the 3.6% propolis gel presented significantly lower mitotic indices than the negative control. Under the present conditions, topical formulations containing different concentrations of propolis used for the treatment of burns showed no clastogenic effect in either test system, but 3.6% propolis gel was found to be cytotoxic in the *in vitro* test.

Keywords: micronuclei, propolis, chromosomal aberrations

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	VI
1. INTRODUÇÃO	04
1.1 QUEIMADURAS	04
1.2 PRÓPOLIS	05
1.3 SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> :	
SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR	09
1.4 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> :	
CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS	15
3.2 AGENTES INDUTORES DE DANOS CROMOSSÔMICOS	16
3.3 SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> :	
SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR	16
3.4 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> :	
CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS	18
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
4. RESULTADOS	21
4.1 SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> :	
SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR	21
4.2 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> :	
CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS	26
5. DISCUSSÃO	31

5.1. SISTEMA-TESTE <i>IN VIVO</i> :	
SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR	32
5.2 SISTEMA-TESTE <i>IN VITRO</i> :	
CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS.	35
6. CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 QUEIMADURAS

As lesões por queimaduras são a terceira causa de morte acidental em todas as faixas etárias; 75% dessas lesões resultam da ação da vítima e ocorrem no ambiente domiciliar [1]. No Brasil, não temos dados estatísticos globais que possam comprovar a gravidade do problema, nem em números de acidentes, nem em internações hospitalares. Entretanto, alguns estudos apontam as crianças como as maiores vítimas desse tipo de acidente [2].

Os agentes que mais comumente produzem queimaduras são os líquidos aquecidos e as substâncias inflamáveis. O diagnóstico etiológico das queimaduras não constitui problema, pois na maioria dos casos o paciente ou o seu acompanhante informa o tipo de agente agressor. Todavia, o diagnóstico preciso quanto à profundidade apresenta alguma dificuldade ao primeiro exame, tornando-se importante saber se as lesões atingiram parcial ou totalmente a derme. Na primeira eventualidade, as queimaduras seriam superficiais: 1º grau (vermelhidão, irritação, ardor e ressecamento da pele) e de 2º grau (vermelhidão, irritação, ardor, ressecamento da pele e formação de bolhas cheias de um líquido claro), e, atingindo totalmente a derme, seriam de 3º grau (machas cinzentas, amareladas ou castanhas, ferida aberta e profunda, às vezes com ausência de dor). De um modo geral, a presença de hiperemia e vesículas indicam queimaduras de 1º e 2º grau e, a presença de necrose ou carbonização, queimaduras profundas [3].

A queimadura está entre os traumas mais graves, pois, além dos problemas físicos que podem levar o paciente à morte, pode acarretar outros problemas de ordem psicológica e social [1]. Investigar a patofisiologia da queimadura é um desafio especial por causa das complexas interações metabólicas entre os órgãos e suas funções, cicatrização das feridas e sistema imune. O melhor entendimento dos efeitos patofisiológicos, que servem para determinar o estado catabólico da queimadura, pode elevar a eficiência dos cuidados clínicos do paciente queimado [4].

Um produto de uso tópico a base de própolis foi desenvolvido e veiculado em um sistema polimérico [5], obtido a partir de polímeros hidrofílicos compostos por poli(oxietileno)-poli(oxipropileno)-poli(oxietileno) (poloxamer 407), inertes e atóxicos e capazes de originar soluções coloidais tipo gel, termorreversíveis na presença de água e que podem afetar o comportamento da solução e a difusão das moléculas da substância ativa [6]. A baixa toxicidade e a irritação cutânea causadas pelo poloxâmer 407 levaram a avaliação do potencial de aplicação dermatológica destes géis, particularmente no tratamento de queimaduras [7], face às vantagens com relação à facilidade de aplicação. Os testes de cicatrização realizados em ratos Wistar mostraram que as lesões cirúrgicas apresentam um completo resultado de cicatrização natural em 7 dias. Os animais tratados com os géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura apresentaram efeito de cicatrização, sendo que os animais tratados com o gel contendo 3,6% de própolis mostraram uma evidente reconstituição epitelial em 3 dias [5].

1.2 PRÓPOLIS

As abelhas existem há mais de 125 milhões de anos e o sucesso evolutivo delas lhes permitiu que se tornassem uma espécie que pode explorar virtualmente a maioria dos habitats da Terra. Este sucesso é em grande parte por causa da composição química e aplicação dos produtos específicos que as abelhas fabricam tais como, mel, cera, veneno, própolis e geléia real. Como a mais importante “arma química” das abelhas contra microrganismos, a própolis tem sido usada como um remédio por humanos desde tempos antigos. Ela é ainda um dos remédios mais freqüentemente usados, aplicado para os tratamentos de feridas e queimaduras, dor de garganta, úlcera de estômago, etc [8].

A palavra própolis é de origem grega, sendo que *pro* significa “em defesa de” e *polis*, “cidade” [9]. As abelhas usam a própolis para diversos propósitos, entre eles lacrar aberturas na colméia, evitar a vibração dos favos, red uzir ao máximo as vias de acesso ao interior da colméia e embalsamar cadáveres de inimigos mortos evitando a proliferação de microrganismos. Além de evitar a entrada

de intrusos, isto contribui mantendo a temperatura interna da colméia ao redor de 35°C [10; 8; 9].

Atualmente, muitos apicultores no Brasil tem na própolis o seu principal produto e desenvolvem meios para maximizar sua produção. Um deles é deixar lacunas longitudinais em ambos os lados da caixa de madeira que abriga a colônia de abelhas. Este método parte do pressuposto que as abelhas depositam própolis em todas as aberturas que elas descobrem na colméia [9]. Telas de plástico também são modificadas em cima dos quadros para serem, pelo mesmo motivo dos vãos, fechados com própolis. As colméias com as laterais móveis parecem ser o melhor método para a obtenção de própolis, mais limpo, mais fácil de coletar, mas é bastante trabalhoso [11].

Para a produção de própolis, as abelhas usam substâncias que resultam de uma variedade de processos metabólicos em partes diferentes das plantas. Estas são substâncias secretadas como também aquelas que aparecem de lesões: materiais lipofílicos em folhas e brotos de folha, goma e resinas [8]. A composição química da própolis depende da fonte botânica, do local de coleta e assim das características geográficas e climáticas locais. Este fato resulta na diversidade notável da composição química da própolis [12; 13] especialmente de própolis que se origina de regiões tropicais [8].

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, de modo geral contém: 56-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, etc [14]. Marcucci (1995) [15] e Bankova et al. (2000) [16] registraram mais de 300 substâncias conhecidas em própolis. Foram encontradas várias substâncias: ácidos aromáticos e alguns dos seus derivados (ácido 4 – hidróxi, benzóico, 4 - metóxi e gálico), ácido cinâmico e alguns dos seus derivados (ácido *p*- cumárico, também sob forma de cumarato de benzila) [17]. Também foram identificados muitos ésteres de ácidos benzílicos cinamílicos. Além destes, foram encontrados vanilina, isovanilina, acetóxi-betulenol, pterostilbeno e xantorreol [18].

Entre os variados tipos de própolis produzidos no Brasil, a própolis verde ganhou preferência no mercado mundial. A cor verde, característica da própolis, é uma conseqüência de sua origem botânica, porque as abelhas coletam tecidos jovens contendo clorofila, isto é, brotos vegetativos e folhas não expandidas de

Baccharis dracunculifolia. Tais folhas jovens contêm tricomas glândulares, provavelmente com óleos voláteis e aromáticos, dando conseqüentemente o típico aroma resinoso da própolis verde [9]. A principal origem botânica da própolis brasileira mostrou ser a espécie *B. dracunculifolia* [19; 20]. Os brotos, as folhas ainda fechadas e as folhas abertas foram coletados separadamente por Park et al. (2004) [21] os quais obtiveram os correspondentes extratos etanólicos. Estes pesquisadores prepararam também o extrato etanólico da própolis coletada na mesma região onde se encontrava a *B. dracunculifolia*. Os extratos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de fase reversa para análise qualitativa e quantitativa dos flavonóides e outros compostos fenólicos. Os picos obtidos foram comparados com a substância pura. Os resultados demonstraram que os compostos químicos encontrados na própolis são os mesmos que os encontrados na *B. dracunculifolia*.

Através de análise em CLAE os pesquisadores identificaram também o ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepelin C), uma conhecida substância antimicrobiana, que estava presente tanto na própolis quanto nos extratos da *B. dracunculifolia*. A presença de artepelin C foi comprovada pela utilização de um padrão autêntico. O pico de absorção demonstrou que o artepelin C estava em maior concentração quando comparado aos demais constituintes químicos. Em um outro estudo feito por CLAE, Kumazawa et al. (2003) [20] relataram a mesma composição de ápices de broto de *B. dracunculifolia* e uma amostra de própolis verde. As combinações principais eram de derivados prenilados e não-prenilados do ácido cinâmico.

As atividades farmacológicas da própolis são conhecidas desde a antiguidade. No Egito era empregada para embalsamar os mortos. A própolis foi muito utilizada como antisséptico bucal e cicatrizante em tratamentos de ferimentos durante a Idade Média e pelos médicos árabes; os incas utilizavam a própolis como agente antipirético e tornou-se muito popular na Europa entre os séculos XVII e XX por sua atividade antibacteriana [12]. Aristóteles recomendou o uso de própolis para tratar abscessos e feridas. Os soldados romanos levavam própolis como um medicamento de emergência para feridas de guerra [11; 9].

Entre 1950 e 1960, a própolis ganhou destaque como um meio para o tratamento de problemas de saúde na antiga União Soviética e em países da Europa Oriental, como a Bulgária, Tchecoslováquia e Polônia. Em países da Europa

Ocidental, na América do Norte e do Sul e no Japão, a própolis não adquiriu popularidade até 1980. Neste último, o primeiro anúncio importante da própolis como uma possibilidade promissora em farmacologia aconteceu em 1985 durante o 30º Congresso Internacional de Apicultura, Nagoya, Japão. Até aquele tempo, a própolis era considerada por apicultores como um subproduto da colméia não desejado, uma vez que não tinha nenhum valor comercial e sua produção significava um declínio na obtenção de mel. Com o crescente interesse em vários países, a partir da década de 80 a própolis tornou-se um produto importante como medicamento complementar e alternativo. O Japão é o principal importador de própolis, com preferência pela própolis do Brasil [9].

A própolis é comumente usada como remédio popular e é disponível na forma de cápsulas, em extrato, em creme dental, pastilhas para garganta, cremes e na forma de pó para ser dissolvido em água [12]. A utilização na indústria cosmética se dá na forma de cremes faciais, pomadas, loções e soluções, sendo usada não só no Brasil como também na França em produtos como sabonetes, água de colônia, *shampoo*, loção após barba e bronzeador. A Romênia e a Rússia possuem especializações medicamentosas a base de própolis muito utilizadas contra acnes [18].

A própolis possui várias atividades biológicas tais como antibacteriana [22; 12; 13] antifúngica [18; 22; 23; 24; 13] antiinflamatória [22; 25; 23; 12; 13], anestésica e propriedades antioxidantes [10; 25; 26]. Recentemente, outras propriedades biológicas têm sido reportadas, incluindo citotoxicidade, atividades anti-HIV [21; 9] e antitumoral [24; 27].

Chi-Feng et al. (2004), [28] trabalhando com ratos Wistar, observaram que o extrato etanólico de própolis melhorou a função do fígado quando comparado com o controle (fígado saudável). O estudo teve como objetivo encontrar métodos efetivos para o tratamento de doenças do fígado provocadas pelo uso indiscriminado do antifúngico econazol. Estes autores postularam que o efeito hepatoprotetor do extrato etanólico da própolis pode ser, em parte, devido à sua capacidade inibitória da peroxidação lipídica da membrana e da formação de radicais livres ou pode ser que seja devido à sua atividade de seqüestrar radicais livres. Assim, o extrato etanólico de própolis seria benéfico no tratamento clínico da hepatite induzida por econazol.

Vários compostos anti-HIV, derivados do ácido morônico, e de um triterpenóide chamado melliferon, foram isolados da própolis brasileira [29]. Apesar de não serem os componentes presentes em maior quantidade, os flavonóides podem ocorrer na própolis verde. Um exemplo é o kaempferide, um composto raro que possui atividade antioxidante [14]. A visão predominante é que a clara atividade biológica dos flavonóides consiste em parte de sua capacidade de proteção contra a ação dos radicais livres [30; 24].

Vários estudos avaliando a atividade antioxidante da própolis foram realizados. Simões et al. (2004) [14] estudaram os efeitos biológicos dos diferentes extratos e frações da própolis verde e basearam-se na avaliação das espécies reativas de oxigênio produzidas pelos neutrófilos de coelhos estimulados por partículas de complexos imunes a opsoninas (anticorpos que tornam bactérias e outras células suscetíveis à fagocitose). Os autores concluíram que os constituintes da própolis atuam por mecanismos diversos seqüestrando as espécies reativas de oxigênio.

Sabendo-se que a própolis tem uma atividade antioxidante significativa, seria muito importante o desenvolvimento de formulações tópicas com extrato de própolis. Marquele et al. (2005) [31] realizaram um estudo para a determinação da atividade antioxidante do extrato da própolis brasileira em formulações tópicas e observaram que quando o extrato é submetido às estas formulações, a atividade antioxidante é mantida protegendo a pele contra danos causados por radicais livres.

Duran et al. (2006) [32] pesquisaram as propriedades antioxidante, antiinflamatória e antibacteriana de uma formulação tópica de própolis no tratamento de queratite causada por *Staphylococcus aureus*. Os resultados demonstraram que a formulação apresentou todas essas propriedades no tratamento de roedores com queratite, e também na prevenção do desenvolvimento de sinais clínicos e histológicos.

1.3 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR

O teste de micronúcleos em roedores é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para se estabelecer a avaliação e o

registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram no mercado [33]. O procedimento original para o teste de micronúcleo foi desenvolvido por Schmid et al. (1976) [34], subsequentemente modificado por Heddle e Salamone (1981) [35].

Os micronúcleos são corpúsculos de cromatina originados da perda de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos acêntricos, que não foram incorporados no núcleo das células-filha durante a mitose [35]. Considerando que diferentes mecanismos podem estar envolvidos na formação dos micronúcleos, incluindo quebras cromossômicas e rompimento do fuso, pode-se dizer que o teste de micronúcleo permite a avaliação de agentes clastogênicos e aneugênicos, respectivamente [36].

Há quatro mecanismos geralmente aceitos pelos quais os micronúcleos podem se formar: a) a perda mitótica de fragmento do cromossomo acêntrico (formando aberrações estruturais); b) conseqüências mecânicas de quebra cromossômica e troca (formando aberrações estruturais); c) perda mitótica de cromossomos inteiros (formando aberrações numéricas); e d) apoptose. O eritrócito é particularmente adequado para análise de micronúcleo, porque durante a maturação do eritroblasto para o eritrócito policromático (PCE) (um período de cerca de 6 horas que seguem a mitose final), o núcleo é expulso tornando mais fácil a identificação do micronúcleo [37].

A análise da freqüência de micronúcleos pode ser obtida em diferentes órgãos com rim [38], medula óssea [39] e sangue periférico [40]. MacGregor et al. (1980) [41], utilizando-se de camundongos, foram os primeiros a demonstrar que o micronúcleo formado na medula óssea poderia ser detectado no sangue periférico. A sua grande vantagem é que os animais podem ser utilizados para a análise de outros parâmetros sem qualquer interferência, uma vez que são requeridas pequenas quantidades de sangue periférico para a análise. Além disso, em casos de exposição prolongada dos animais, muito comum em testes toxicológicos, é possível obter amostras repetidas do mesmo animal em diferentes tempos, uma vez que não requer o seu sacrifício [40].

Outra vantagem do teste de micronúcleo *in vivo* está na possibilidade de se utilizar qualquer tipo de roedor, permitir tratamentos subagudos e crônicos, além de ser possível a contagem dos eritrócitos maduros, mesmo após o tratamento crônico [42]. Há também a possibilidade de utilização de várias formas de administração, dentre as quais se pode citar subcutânea e gavagem [43].

Os micronúcleos são analisados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, se transformando então em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (RNA-positivos), e coram-se em azul. Assim, os micronúcleos analisados nesse tipo de célula foram formados na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do PCE é de 8 a 12 horas, os micronúcleos encontrados foram induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração de estágio de policromático, ou seja, entre 10 a 24 horas [44].

A porcentagem de PCE entre o total de eritrócitos (PCE + NCE [normocromático]) deve ser determinada a fim de se avaliar a citotoxicidade, podendo também ser usada para documentar a biodisponibilidade da substância teste no tecido alvo. A toxicidade é indicada por uma redução significativa na porcentagem de PCE, e é determinada pela análise de pelo menos 200 eritrócitos por animal, para pelo menos 5 animais por grupo de tratamento.

É recomendado incluir um grupo controle positivo em todo experimento, para assegurar que o teste está sendo realizado de acordo com os padrões estabelecidos. Uma indução significativa de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) deve ser observada nos animais controle positivo, para que o resultado negativo do teste de micronúcleo possa ser aceito [33].

1.4 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

As aberrações cromossômicas e trocas de cromátides-irmãs são parâmetros citogenéticos de mutagenicidade. As aberrações cromossômicas são alterações na estrutura do cromossomo resultante de quebra ou de troca de material genético. A maioria das alterações cromossômicas é letal, porém, há várias que são viáveis e podem causar efeitos genéticos tanto somáticos como hereditários. A troca de cromátides-irmãs representa uma troca simétrica da fita complementar do DNA entre as cromátides-irmãs dentro de um único cromossomo. A maioria dos agentes

mutagênicos induz mutações por mecanismo direto, onde a substância química atua diretamente sobre o DNA, mas também por mecanismo indireto como, por exemplo, dano oxidativo ou inibição da síntese de DNA [45].

A análise de aberrações cromossômicas em culturas de células de mamíferos, como várias linhagens provenientes de hamster Chinês, tais como células V79 (pulmonares), CHL (*chinese hamster lung*, pulmão de hamster Chinês), CHO (*chinese hamster ovary*, ovário de hamster Chinês), etc., são muito úteis para a detecção de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos [46].

As culturas utilizadas nos testes *in vitro* nem sempre fazem a metabolização adequada dos compostos químicos, assim os laboratórios usam a fração S9 (fração microsomal de fígado de ratos tratados com aroclor 1254). Para Galloway et al. (1994) [47] a ativação metabólica deve ser feita com a fração S9. Qualquer concentração entre 1 a 10% (v/v) do fígado homogeneizado S9 pode ser usada no meio de cultura final. Soro também deve ser adicionado ao meio de cultura sempre que o tratamento for durar mais que 3 horas a fim de evitar os efeitos da ausência do soro sobre as células.

Segundo alguns protocolos internacionalmente aceitos [45; 47; 48] a dose máxima recomendada de um composto teste deve ser 10mM ou 5mg/mL, quando o peso molecular não é conhecido ou misturas estão sendo testadas, a menos que seja limitado pela citotoxicidade. Este limite de concentração é estabelecido para evitar a indução de aberrações devido ao aumento da osmolaridade do meio de cultura. Os extremos de pH também são conhecidos por induzir quebras cromossômicas, sendo que o pH do meio de cultura deve ficar dentro da escala fisiológica devendo ser ajustado imediatamente após a adição da substância teste no meio de cultura, se necessário.

A citotoxicidade deve ser determinada usando um apropriado indicador de integridade celular e crescimento, tal como medida de confluência, contagem de células viáveis ou índice mitótico. A importância da determinação do limite da toxicidade foi baseada na observação que muitos compostos causam aberrações somente em concentrações que produzem um aumento da citotoxicidade. Um limite de 50% foi sugerido por experimentos realizados em diferentes laboratórios e com vários sistemas-testes, incluindo as células CHO. Pelo menos, 200 células devem ser analisadas por dose e controle. As células devem conter um número de centrômeros igual ao número modal ± 2 [47]. Pelo menos três concentrações da

substância a ser testada são recomendadas para os tratamentos. Altas concentrações do composto para o teste de citotoxicidade devem ter resultado na redução do índice mitótico de 20 – 25% comparado com o controle negativo, a menos que limitado pela solubilidade do composto teste [45].

O uso de controle positivo também faz parte de todo estudo de genética toxicológica *in vitro*. Há várias vantagens como verificar as condições de manutenção dos animais, facilitar a comparação de dados de um laboratório para outro, ajudar no estabelecimento de critérios mínimos de aceitação do ensaio, e assegurar precisamente que todos os passos em um experimento foram seguidos. Como controle positivo, deve ser empregado conhecidos agentes clastogênicos para uma adequada reprodutibilidade e detectável aumento de alterações demonstrando a sensibilidade do sistema-teste [49].

As culturas devem ser expostas à substância teste por 3-6 horas, e com tempo de fixação equivalente a um ciclo e meio de divisão celular a partir do início do tratamento. Segundo Galloway et al. (1994) [47] em células com um tempo de ciclo de 13 horas, o cultivo deve ser de 20 horas a partir do início do tratamento, e se o resultado for negativo em experimentos com e sem ativação metabólica, um tratamento contínuo deve ser realizado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Os efeitos terapêuticos da própolis sobre algumas doenças humanas têm levado a um grande interesse no entendimento de suas propriedades biológicas relacionadas à sua composição química. Os mecanismos responsáveis pelas melhorias nas condições de saúde observadas com o uso na medicina popular ainda não estão completamente elucidados. Uma vez que os géis contendo diferentes concentrações de própolis (1,2%; 2,4% e 3,6%) para queimadura apresentaram eficiência no teste de cicatrização, e para que possam ser utilizados pela população

humana com mais segurança, tornou-se relevante avaliar se tais substâncias estavam envolvidas na indução de danos cromossômicos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a mutagenicidade dos géis em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No sistema-teste *in vivo* foi utilizado células do sangue periférico de ratos Wistar cujos objetivos foram:

- avaliar as freqüências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em animais submetidos aos tratamentos dérmicos subagudo e subcrônico com os géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles;
- determinar os valores de índice de divisão nuclear (IDN) nos grupos tratados de maneira subaguda e subcrônica com os géis contendo diferentes concentrações de própolis, e seus respectivos controles.

As células de ovário de hamster Chinês foram utilizadas para análise *in vitro* do potencial mutagênico dos géis, sendo os objetivos descritos a seguir:

- analisar as freqüências de aberrações cromossômicas observadas em culturas tratadas em pulso de 3 horas e continuamente (20 horas) com géis contendo diferentes concentrações de própolis, e seus respectivos controles;
- calcular os índices mitóticos (IM) nas culturas submetidas aos tratamentos por 3 horas e contínuo com os géis contendo diferentes concentrações de própolis, e seus respectivos controles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS

O gel contendo própolis para queimadura foi fornecido pela Apis Flora Comercial e Industrial Ltda. (Ribeirão Preto, São Paulo). O desenvolvimento da formulação envolveu a pesquisa da concentração do polímero, a escolha do extrato de própolis (hidroalcoólico ou glicólico) e a padronização deste, pesquisa físico-química da formulação em função dos constituintes adicionais à formulação. Os géis foram preparados pelo método a frio de acordo com Schmolka (1972) [50], onde se dispersou o polímero em água destilada, sob agitação constante. Foram preparadas duas amostras controle, sendo a primeira constituída pela dispersão do polímero e a segunda pelo agente solubilizante utilizado para a obtenção de um gel límpido. As três formulações estudadas contendo extrato padronizado de própolis apresentaram respectivamente 1,2%; 2,4% e 3,6% p/v de extrato seco de própolis [5].

A análise da composição química do extrato de própolis utilizado nas formulações tópicas foi realizada pelo Prof. Dr. Jairo K. Bastos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. O extrato de própolis foi submetido a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a qual permitiu a identificação dos seguintes compostos: ácido cumárico (ácido *p* – cumárico); aromadendrina (aromadendrina – 4 – o – metil ester); drupanina (ácido 3 – prenil *p* – cumárico); artepelin C (ácido 3,5 – diprenil *p* – cumárico) e baccharina (ácido 3 – prenil – 4 – diidrocinamoiloxi – cinâmico) (Figura 1).

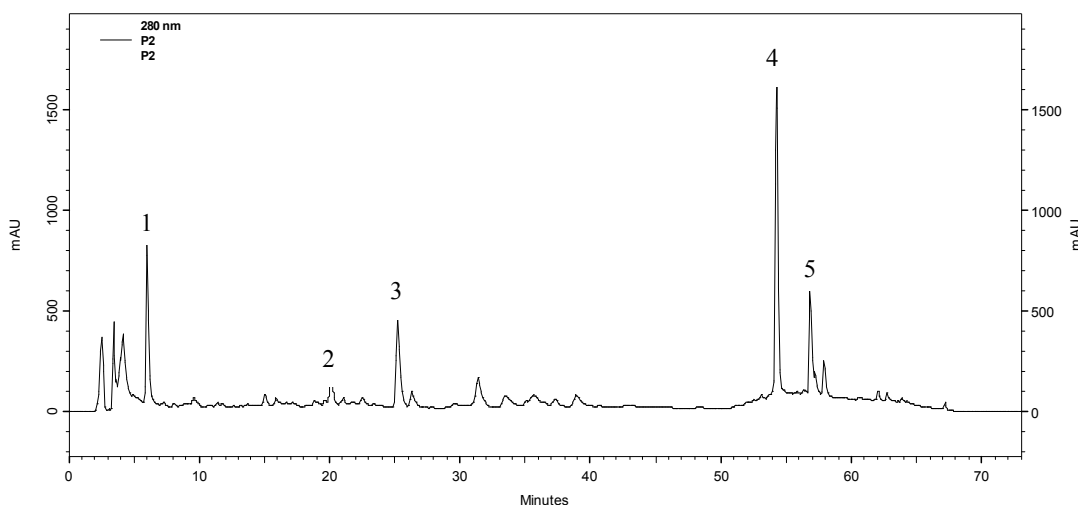


Figura 1: Os compostos quantificados foram: 1 – ácido cumárico, 2 – aromadendrina, 3 – drupanina, 4 – artepelin C e 5 – baccharina.

3.2 AGENTES INDUTORES DE DANOS CROMOSSÔMICOS

O quimioterápico ciclofosfamida (CPA, Sigma-Aldrich) e doxorubicina (DXR, Pharmacia Brasil Ltda.) foram utilizados no presente trabalho nos sistemas-testes *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, como indutores de danos cromossômicos (controle positivo). A CPA foi dissolvida em água destilada e administrada intraperitonealmente, e a DXR foi dissolvida em água destilada estéril.

3.3 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR

Para a realização dos experimentos foram utilizados 30 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, com peso inicial de aproximadamente 45 g de peso corpóreo (p.c.), procedentes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em caixas de plástico em uma sala experimental com condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\pm 10\%$) e sobre um ciclo de luz de 12 horas

claro/12 horas escuro. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Franca (processo nº 121/05).

Como o gel utilizado do presente trabalho se destina ao tratamento de lesões originadas de queimaduras, os animais foram submetidos a lesão dorsal com o aparelho “punch” (Figura. 2), utilizando previamente anestésico (ketamina, midazolan e acepran) intraperitoneal [4]. As concentrações dos géis contendo própolis para queimadura que foram utilizadas no presente trabalho, bem como o protocolo de tratamento, foram determinados de acordo com os estudos histológicos da ação dos géis sobre a cicatrização, realizados anteriormente [51]. Para a realização dos experimentos, as concentrações de própolis nos géis foram: 1,2%, 2,4% e 3,6% p/v. Além dos animais tratados com géis contendo diferentes concentrações de própolis, também foram realizados grupos de animais tratados com gel sem própolis, controles negativo e positivo (CPA, 50mg/kg p.c., intraperitoneal).

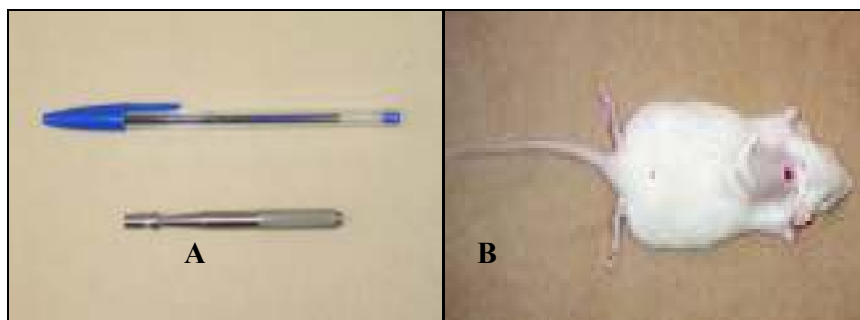


Figura 2 - Aparelho “punch” usado para a realização da lesão dorsal (A); animal com lesão dorsal (B).

Para cada grupo de tratamento foram utilizados cinco animais. Os animais foram submetidos à exposição subaguda (7 dias) e subcrônica (30 dias) aos géis, com e sem própolis, tratados dermicamente e pesados diariamente.

Os grupos de tratamento foram:

1. Controle negativo
2. Gel sem própolis
3. Gel 1,2%
4. Gel 2,4%
5. Gel 3,6%

6. Controle positivo (CPA, 50mg/kg p.c.)

Para a obtenção de micronúcleos de sangue periférico de ratos Wistar foi utilizada a técnica de MacGregor et al. (1980) [41]. Os esfregaços de sangue periférico foram realizados 7 e 30 dias após o início da aplicação dos géis contendo diferentes concentrações de própolis nas lesões dorsais dos animais. A CPA foi administrada no 6º dia de tratamento, sendo os esfregaços de sangue periférico realizados 24 horas após o tratamento.

A técnica para obtenção da frequência de PCEMNS se encontra descrita a seguir:

- colheu-se o material da cauda do animal, fazendo um corte e gotejando-se o sangue diretamente sobre a lâmina seca. Com uma lamínula fez-se o esfregaço;
- o material secou a temperatura ambiente e fixou-se em metanol por 5 minutos;
- corou-se com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:10) por 20 minutos apenas no dia seguinte.

As frequências de PCEMNs foram obtidas a partir da análise de 2000 PCEs/animal. Por meio da análise de 400 eritrócitos por animal foi determinado o IDN (PCE/PCE+NCE), ou seja, a percentagem PCE entre o total de eritrócitos, a fim de avaliar a citotoxicidade dos tratamentos [52].

3.4 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

A linhagem empregada para a realização dos experimentos foi a CHO₉, procedente do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Esta linhagem encontra-se estocada em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de 1×10^6 células/mL, em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (HAM F10 + DEM, na proporção 1:1, Sigma-Aldrich), 40% de soro bovino fetal (Nutricell) e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich).

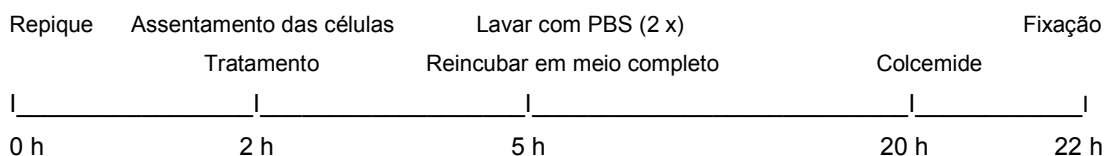
As células foram descongeladas e colocadas em cultivo em meio de cultura (HAM F10 + DEM, 1:1, Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro

bovino fetal, 1,2 g/mL de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), 0,1 g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 0,06 g/mL de penicilina (Sigma-Aldrich).

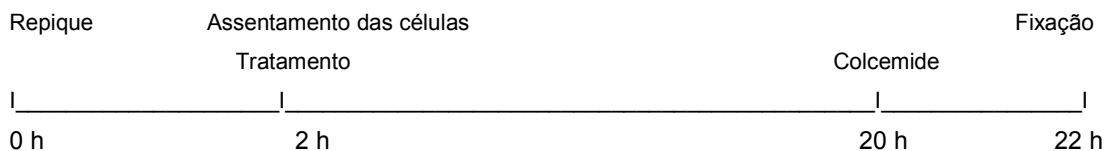
As células foram cultivadas em monocamadas em 10 mL de meio de cultura utilizando-se frascos estéreis descartáveis de 25 cm² de área (Corning) a 37° C em estufa de B.O.D. (Marconi). A cada dois ou três dias, quando apresentavam uma boa confluência, as células foram subcultivadas. Foi removido o meio de cultura e as células foram lavadas usando-se PBS (*phosphate buffer saline*) e ATV (solução de tripsina 0,2% + versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz) na proporção de 1 ATV: 1 PBS, para desprender as células de superfície interna do frasco de cultura. Após o despreendimento das células, 1,5 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao frasco para a inativação do ATV e homogeneizado. Uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novos frascos contendo 10 mL de meio de cultura e foram incubadas a 37°C.

Cerca de 2 horas antes do início dos experimentos, as células foram subcultivadas e uma quantidade de aproximadamente 1×10^6 de células em fase exponencial de crescimento foram semeadas em cada frasco de cultura para serem tratadas. Para a contagem das células foi utilizada a câmara de Neubauer. As culturas foram tratadas com 5mg/mL de cada um dos géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura (1,2%; 2,4% e 3,6%). Foram realizados 2 protocolos de tratamentos, em pulso de 3 horas e contínuo (20 horas), como mostra os delineamentos experimentais apresentados a seguir:

Tratamento em pulso de 3 horas:



Tratamento contínuo (20 horas):



Os grupos de tratamento foram:

1. Controle negativo
2. Controle solvente (DMSO, 10 μ L/mL)
3. Gel sem própolis
4. Gel 1,2%
5. Gel 2,4%
6. Gel 3,6%
7. Controle positivo (DXR, 1,0 μ g/mL - contínuo e 2,0 μ g/mL – pulso de 3 horas)

Para bloquear as células em metáfase, 2 horas antes da fixação foi adicionada uma solução de colcemide (0,1 μ g/mL). As preparações metafásicas para a análise convencional de aberrações cromossômicas foram obtidas de acordo com os procedimentos descritos a seguir:

- transferiu-se o material para tubos de centrifuga, lavou-se cada frasco de cultura com 5mL de PBS;
- adicionou-se 0,5mL de solução 1 PBS: 1 ATV para desprender as células;
- colocou-se 5mL de meio de cultura para a inativação do ATV e transferiu-se para o tubo de centrifuga;
- centrifugou-se a 1000 rpm por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se 10mL de solução hipotônica de citrato de sódio 1% a 37°C por 12 minutos;
- centrifugou-se a 1000 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, homogenizou-se o sedimento e acrescentou-se 5mL de fixador (3 metanol:1 ácido acético) recém-preparado;
- repetiu-se esse procedimento mais 2 vezes e, na última etapa, ressuspendeu-se com cerca de 0,5mL de fixador.

As lâminas imersas em água destilada gelada foram utilizadas. A coloração foi feita com Giemsa diluído em tampão fosfato pH 6,8 (1:30) por 5 minutos. As lâminas foram analisadas em teste cego. A análise foi realizada em metáfases bem espalhadas, sem sobreposição e com 21 \pm 2 cromossomos. Foram

analisadas 100 metáfases/cultura em microscópio de luz e em objetiva de imersão. Para a obtenção do IM foi contado o número de metáfases em 2000 células/cultura.

Foram realizadas 3 repetições para cada tratamento considerando os delineamentos experimentais em pulso de 3 horas e contínuo, sendo analisadas em cada um 300 metáfases por grupo de tratamento para a determinação da frequência de aberrações cromossômicas e 6000 células para a obtenção do IM. As aberrações cromossômicas foram classificadas de acordo com Savage (1976) [53].

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de frequências de PCEMNs e IDN obtidos no sistema-teste *in vivo* bem como de aberrações cromossômicas, metáfases alteradas e IM observados no sistema-teste *in vitro* foram analisados estatisticamente pelo método de Tukey com o nível de significância igual a $P= 0,05$. Os *gaps* não foram incluídos na análise estatística, uma vez que o seu significado citogenético não é bem estabelecido.

4 RESULTADOS

4.1 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR

Os resultados obtidos das análises das frequências de PCEMNs de sangue periférico (Figura 3) de animais submetidos aos tratamentos subagudo e subcrônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis estão apresentados nas Tabelas 1 a 3 e Figura 4. Os dados mostraram que há uma pequena variabilidade interindividual na frequência de PCEMNs em cada um dos grupos de tratamento (Tabelas 1 e 2). Quando os resultados são somados em cada grupo de tratamento observa-se que no tratamento subagudo, os géis 2,4% e 3,6%

apresentaram frequência de PCEMNs maiores quando comparados ao controle. Porém, esse aumento não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$). No tratamento subcrônico, os grupos tratados com as diferentes concentrações de géis apresentaram frequências de PCEMNs menores em relação ao controle, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($P>0,05$).

Como era esperado, os animais tratados com CPA apresentaram um aumento significativo de PCEMNs ($P<0,05$) quando comparados ao grupo controle (Tabela 3).

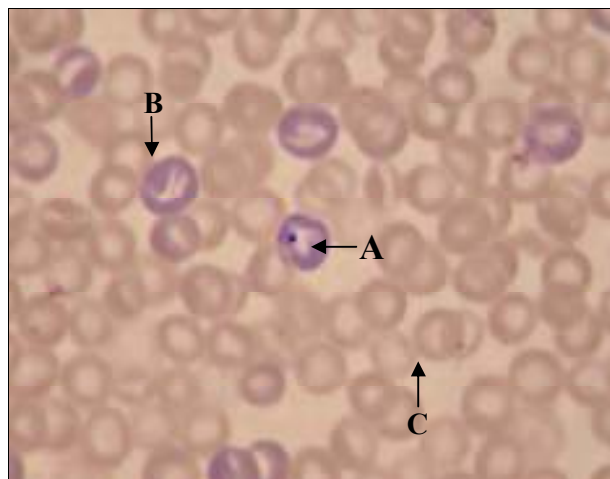


Figura 3 – Fotomicrografia óptica de eritrócito policromático micronucleado (A), sem micronúcleo (B) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (C), de ratos Wistar (Giemsa; 1000x).

Uma análise comparativa dos resultados de PCEMNs obtidos no diferentes grupos de tratamentos nos dois tempos de exposição pode ser observada na figura 3. É notório uma diminuição na frequência de PCEMNs nos grupos submetidos a exposição subcrônica em relação àqueles expostos de maneira subaguda aos géis. Esta diminuição pode ter ocorrido por uma adaptação dos animais às condições de manutenção. Entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($P>0,05$).

A análise do IDN obtida para os tratamentos dérmicos subagudo e subcrônico não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) nas médias de PCE sob o total de eritrócitos entre animais tratados com os géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura e respectivos controles (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra as médias do peso corpóreo inicial, peso corpóreo final e ganho de peso dos animais durante o período de experimento (30 dias). Nenhuma diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) foi observada para essas variáveis.

Tabela 1 - Frequências de PCEMNs em sangue periférico de ratos Wistar submetidos ao tratamento dérmico subagudo com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles

Tratamento	Animal	Nº de PCEs Analisados	Nº de PCEMNs
Controle	M1	2000	3
	M2	2000	4
	M3	2000	1
	M4	2000	0
	M5	2000	1
Gel sem Própolis	M1	2000	2
	M2	2000	2
	M3	2000	2
	M4	2000	1
	M5	2000	1
Gel 1,2%	M1	2000	2
	M2	2000	6
	M3	2000	0
	M4	2000	1
	M5	2000	0
Gel 2,4%	M1	2000	3
	M2	2000	0
	M3	2000	6
	M4	2000	1
	M5	2000	5
Gel 3,6%	M1	2000	2
	M2	2000	1
	M3	2000	0
	M4	2000	2
	M5	2000	10
CPA	M1	2000	23
	M2	2000	15
	M3	2000	6
	M4	2000	22
	M5	2000	23

M, macho.

Tabela 2 - Frequências de PCEMNs em sangue periférico de ratos Wistar submetidos ao tratamento dérmico subcrônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles

Tratamento	Animal	Nº de PCEs Analisados	Nº de PCEMNs
Controle	M1	2000	1
	M2	2000	4
	M3	2000	2
	M4	2000	1
	M5	2000	2
Gel sem Própolis	M1	2000	0
	M2	2000	0
	M3	2000	2
	M4	2000	1
	M5	2000	0
Gel 1,2%	M1	2000	2
	M2	2000	1
	M3	2000	0
	M4	2000	1
	M5	2000	2
Gel 2,4%	M1	2000	0
	M2	2000	2
	M3	2000	0
	M4	2000	0
	M5	2000	3
Gel 3,6%	M1	2000	0
	M2	2000	0
	M3	2000	1
	M4	2000	1
	M5	2000	1
CPA	M1	2000	23
	M2	2000	15
	M3	2000	6
	M4	2000	22
	M5	2000	23

M, macho.

Tabela 3 – Frequências de PCEMNs e índices de divisão nuclear (IDN) de sangue periférico de ratos Wistar submetidos aos tratamentos dérmicos subagudo e subcrônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles

Tratamentos (n=5 ratos/grupo)	Subagudo		Subcrônico	
	PCEMNs*	IDN**	PCEMNs*	IDN**
Controle	0,09	0,14±0,03	0,10	0,12±0,02
Gel sem própolis	0,08	0,14±0,04	0,03	0,10±0,03
Gel 1,2%	0,09	0,16±0,03	0,06	0,13±0,02
Gel 2,4%	0,15	0,17±0,05	0,05	0,12±0,03
Gel 3,6%	0,15	0,13±0,02	0,03	0,12±0,02
CPA	0,89	0,15±0,03	0,89	0,15±0,03

Foram analisadas 2.000 células por animal, para um total de 10.000 células por tratamento.

CPA, ciclofosfamida (50mg/kg p. c.)

* Valores em porcentagem

** Valores em média±desvio padrão

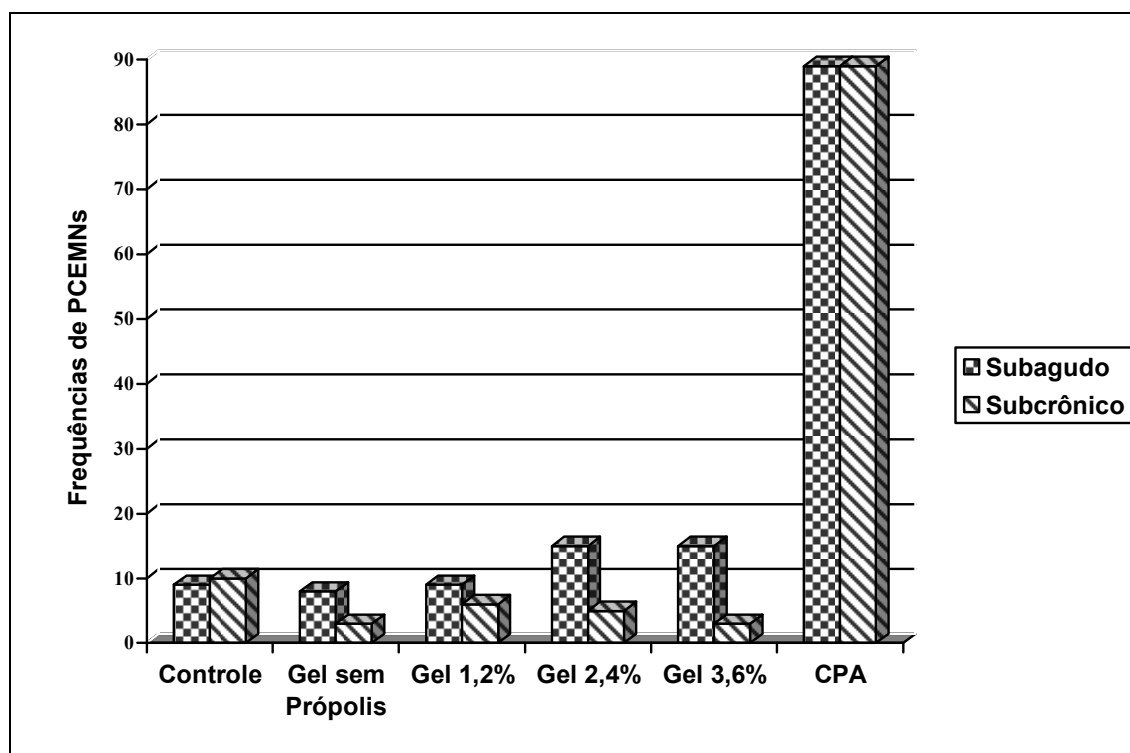


Figura 4 - Frequências de PCEMNs em ratos Wistar submetidos aos tratamentos subagudo e subcrônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles.

Tabela 4 – Médias de peso corpóreo inicial, peso corpóreo final e ganho de peso depois de 30 dias de tratamento com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles

Tratamentos (n=5 ratos/grupo)	Peso corpóreo inicial (g)*	Peso corpóreo Final (g)*	Ganho de peso corpóreo (g)*
Controle	48,3±8,0	177,2±8,1	270,6±6,0
Gel sem própolis	48,3±8,4	164,9±7,6	229,0±15,8
Gel 1,2%	49,3±7,5	139,4±16,7	209,5±23,5
Gel 2,4%	50,4±9,8	147,4±21,9	211,4±31,9
Gel 3,6%	47,7±9,0	152,2±25,2	238,8±42,9

*Valores em média ±desvio padrão

4.2 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

Os resultados obtidos da análise das freqüências de aberrações cromossômicas (Figura 5) nos tratamentos em pulso de 3 horas e contínuo com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles, estão apresentados nas Tabelas 5 a 8 e Figura 6. Os resultados mostraram que houve uma pequena variabilidade na freqüência de aberrações cromossômicas entre as três repetições nos dois tempos de tratamentos (Tabelas 5 e 6). Quando os dados foram somados, pode-se observar que as culturas tratadas em pulso de 3 horas com géis contendo 1,2% e 2,4% de própolis mostraram um pequeno aumento no número de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas quando comparadas ao grupo controle, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($P>0,05$) (Tabela 7). No tratamento contínuo, as culturas tratadas com géis contendo 2,4% e 3,6% de própolis apresentaram freqüências de aberrações cromossômicas e metáfases alteradas ligeiramente superiores àquelas do controle negativo, mas sem significância estatística ($P>0,05$) (Tabela 8).

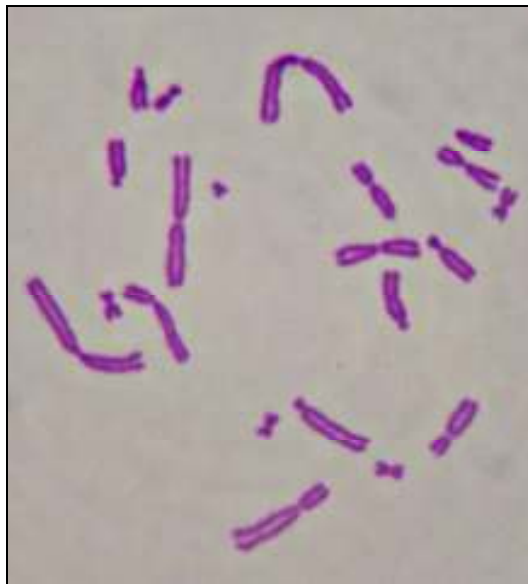


Figura 5 – Fotomicrografia óptica de célula metafásica de ovário de hamster Chinês (Giemsa; 1000x).

Na Figura 6 pode-se observar em todos os tratamentos e controles negativo que os dois delineamentos experimentais, em pulso de 3 horas e contínuo, apresentaram freqüências de aberrações cromossômicas que não diferiram estatisticamente, sendo que no tratamento contínuo o gel contendo 3,6% de própolis mostrou um aumento não significativo ($P>0,05$) em relação às culturas tratadas em pulso de 3 horas.

As aberrações cromossômicas mais freqüentes foram quebras cromatídicas e isocromatídicas, seguidas de *gaps* cromatídicos. Houve também a observação de aberrações como *exchange*, figuras trirradiais, quadrirradiais, anéis e dicêntricos (Tabela 7 e 8).

Os resultados obtidos das análises de IM nas culturas submetidas ao tratamento de pulso de 3 horas com os géis contendo diferentes concentrações de própolis mostraram ausência de diferenças estatisticamente significativas entre as culturas tratadas e seus respectivos controles (Tabela 7). No tratamento contínuo, observou-se valores de IM menores nas culturas tratadas com géis contendo 2,4% e 3,6% de própolis em relação ao controle, mas esta redução foi estatisticamente significativa ($P<0,05$) somente no tratamento com gel contendo 3,6% de própolis (Tabela 8).

Tabela 5 – Frequências de aberrações cromossômicas (AC), metáfases alteradas (MA) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento em pulso de 3 horas com géis contendo diferentes concentrações de própolis, e respectivos controles

Tratamento	Aberrações Cromossômicas				Total	MA	IM%
	G´	Q´	Q´´	OTA			
Controle	1	2	0	1Ex	4	4	5,95
	0	0	0	0	0	0	4,10
	0	1	1	0	2	2	8,10
DMSO (10µL/mL)	0	2	0	1Tr	3	3	4,95
	0	2	0	0	2	2	5,30
	0	1	0	0	1	1	4,50
Gel sem Própolis	0	0	1	0	1	1	4,95
	0	1	1	0	2	2	4,05
	0	4	0	0	4	4	3,80
Gel 1,2%	0	2	2	0	4	4	9,15
	0	2	0	0	2	2	8,45
	1	5	0	1Ex	7	7	9,65
Gel 2,4%	1	0	0	0	1	1	9,95
	0	3	0	1Tr	4	4	7,65
	0	5	0	1Ex	6	6	7,85
Gel 3,6%	0	0	0	1Ex, 1Qr	2	2	6,05
	1	0	0	1Ex	2	2	9,00
	0	1	0	0	1	1	9,35
DXR (2,0µg/mL)	0	8	2	1Ex, 3 A	14	14	5,50
	3	7	9	1Ex	20	20	8,85
	0	6	4	1Ex, 1A	12	12	8,65

G´, *gap* cromatídico; Q´, quebra cromatídica; Q´´ quebra isocromatídica; OTA, outros tipos de alterações; A, anel; Ex, *complex exchange*; Tr, figura trirradial; Qr, figura quadrirradial.

Tabela 6 – Frequências de aberrações cromossômicas (AC), metáfases alteradas (MA) e índices mitóticos (IM) observados em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento contínuo (20 horas) com géis contendo diferentes concentrações de própolis, e respectivos controles

Tratamento	Aberrações Cromossômicas				Total	MA	IM%
	G´	Q´	Q``	OTA			
Controle	0	0	1	0	1	1	7,15
	0	3	2	0	5	5	6,50
	0	3	0	0	3	3	4,60
DMSO (10µL/mL)	1	0	1	0	2	2	7,65
	0	3	1	0	4	4	1,95
	1	1	3	0	5	5	4,55
Gel sem Própolis	0	2	1	0	3	3	5,15
	0	0	1	1Ex	2	2	5,20
	0	3	0	0	3	3	5,15
Gel 1,2%	0	1	1	0	2	2	8,40
	4	3	0	2Ex	9	9	6,10
	0	0	0	0	0	0	5,80
Gel 2,4%	1	1	0	2Ex, 1Tr	5	5	1,70
	0	4	1	2Dc	7	7	4,50
	0	4	0	1Ex	5	5	1,70
Gel 3,6%	0	2	0	0	2	2	1,50
	0	6	0	4Ex, 2 Qr	12	12	0,70
	0	7	0	0	7	7	0,50
DXR (1,0µg/mL)	0	3	1	6Ex, 4Qr, 2Dc	16	16	2,80
	4	6	4	2Ex, 1Qr	17	17	6,55
	1	6	5	0	12	12	8,55

G´, *gap* cromatídico; Q´, quebra cromatídica; Q`` quebra isocromatídica; OTA, outros tipos de alterações. Ex, *complex exchange*; Tr, figura trirradial; Qr, figura quadrirradial; Dc, dicêntrico.

Tabela 7 - Somatória das freqüências de aberrações cromossômicas (AC), metáfases alteradas (MA) e valores de índices mitóticos (IM) observados em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento em pulso de 3 horas com géis contendo diferentes concentrações de própolis, e seus respectivos controles

Tratamentos	Aberrações cromossômicas				Total	AC/100 células	MA	IM% Média±DP
	G´	Q´	Q´´	OTA				
Controle	1	3	1	1Ex	6	2,0	6	6,05±2,00
DMSO (10µL/mL)	0	5	0	1Tr	6	2,0	6	4,92±0,40
Gel sem Própolis	0	5	2	0	7	2,3	7	4,26±0,60
Gel 1,2%	1	9	2	1Ex	13	4,4	13	9,08±0,60
Gel 2,4%	1	8	0	1Ex, 1Tr	11	3,7	11	8,48±1,27
Gel 3,6%	1	1	0	2Ex, 1Qr	5	1,7	5	8,13±1,81
DXR (2,0µg/mL)	3	21	15	3Ex, 4A	46	15,3	46	7,67±1,87

Para cada tratamento foram analisadas 300 células metafásicas. G´, *gap* cromatídico; Q´, quebra cromatídica; Q´´ quebra isocromatídica; OTA, outros tipos de alterações; A, anel; Ex, *complex exchange*; Tr, figura trirradial; Qr, figura quadrirradial.

Tabela 8 - Somatória das freqüências de aberrações cromossômicas (AC), metáfases alteradas (MA) e valores de índices mitóticos (IM) observados em culturas de células de ovário de hamster Chinês submetidas ao tratamento contínuo (20 horas) com géis contendo diferentes concentrações de própolis, e seus respectivos controles

Tratamentos	Aberrações cromossômicas				Total	AC/100 células	MA	IM% Média±DP
	G´	Q´	Q´´	OTA				
Controle	0	6	3	0	9	3,0	9	6,08±1,32
DMSO (10µL/mL)	2	4	5	0	11	3,7	11	4,72±2,83
Gel sem Própolis	0	5	2	1Ex	8	2,7	8	5,15±0,02
Gel 1,2%	4	4	1	2Ex	11	3,7	11	6,77±1,44
Gel 2,4%	1	9	1	3Ex, 1Tr, 2Dc	17	5,7	17	2,63±1,61
Gel 3,6%	0	15	0	4Ex, 2Qr	21	7,0	21	0,90±0,52 ^a
DXR (1,0µg/mL)	5	15	10	8Ex, 6Qr, 4Dc	48	16,0	48	5,97±2,91

Para cada tratamento foram analisadas 300 células metafásicas. G´, *gap* cromatídico; Q´, quebra cromatídica; Q´´ quebra isocromatídica; OTA, outros tipos de alterações, Ex, *complex exchange*; Tr, figura trirradial; Qr, figura quadrirradial.

^aSignificativamente diferente do controle ($P<0,05$)

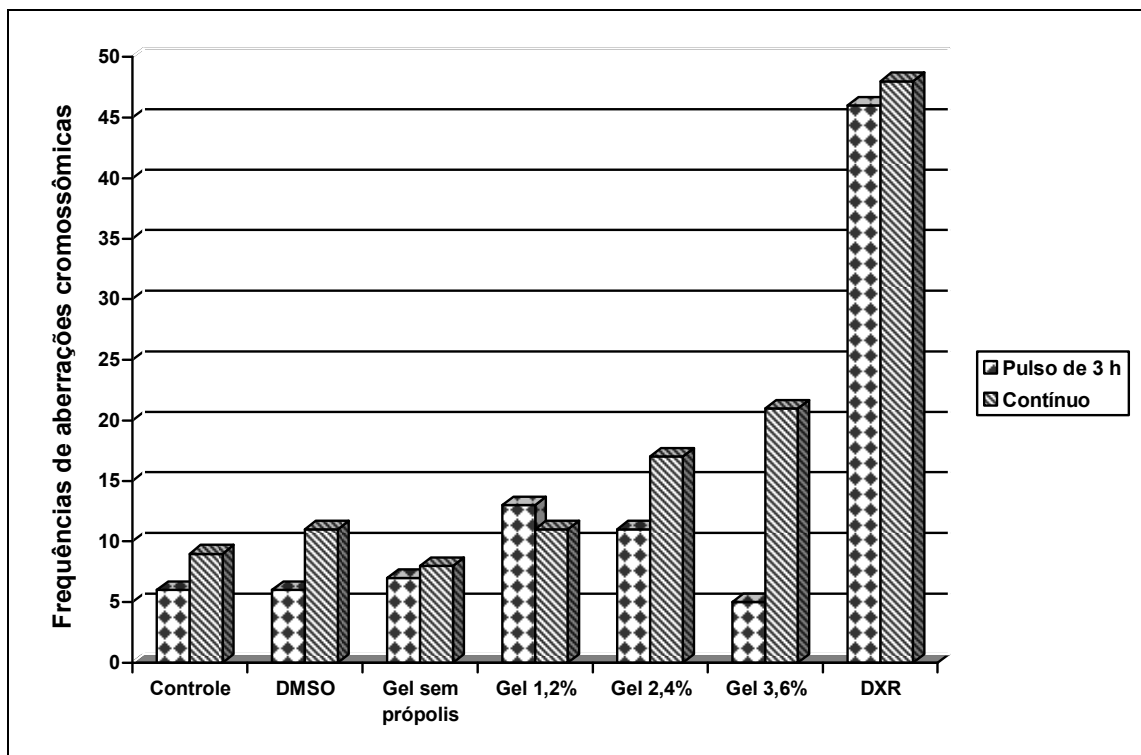


Figura 6 – Freqüências de aberrações cromossômicas observadas em culturas de células de ovário de hamster Chinês tratadas em pulso de 3 horas e continuamente com géis contendo diferentes concentrações de própolis, e seus respectivos controles.

5 DISCUSSÃO

Própolis é o nome genérico para substâncias resinosas que são coletadas de várias plantas pelas abelhas e tem sido usada na medicina popular desde 300 a.C. É sabido que a própolis possui atividades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e anti-úlceras [21]. Nos últimos anos, a própolis tem ganhado popularidade, sendo utilizada extensivamente em comidas e bebidas, e também por proporcionar benefícios à saúde humana prevenindo doenças como inflamação, cardiopatia, diabetes e até mesmo o câncer [23].

A própolis foi usada como remédio pelos humanos desde tempos remotos, e ainda é frequentemente usada no tratamento de ferimentos e queimaduras, dor de garganta, úlcera de estômago, etc. Por isso, a própolis se tornou o assunto de intensos estudos farmacológicos e químicos durante os últimos

30 anos. É notório que a utilização da própolis na cultura popular dentro da vida contemporânea vem se destacando ainda mais. Muitos estudos têm sido publicados divulgando e revisando as propriedades biológicas da própolis, como por exemplo, antimicrobiana, cicatrizante, antiprotozoária e antiviral [8]

A composição da própolis é muito complexa, pois depende do local de coleta, da estação e da planta. Mais de 300 compostos como polifenóis, aldeídos fenólicos, sequiterpenos, cumarinas, aminoácidos, esteróides e compostos inorgânicos têm sido encontrados em amostras de própolis [9].

Devido às diversas atividades biológicas da própolis e seu uso em alimentos, bebidas e na medicina popular, há um grande interesse no conhecimento da composição química e no entendimento dos mecanismos relacionados à sua ação terapêutica. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou o potencial mutagênico de géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura em células de mamíferos *in vivo* e *in vitro*.

5.1 SISTEMA-TESTE *IN VIVO*: SANGUE PERIFÉRICO DE RATOS WISTAR

Os resultados obtidos em sangue periférico de ratos Wistar mostraram que estes géis não aumentaram as freqüências de PCEMNs. É importante fazer algumas considerações sobre o sistema-teste *in vivo* empregado no presente trabalho. O teste de micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos [54; 42]. As características básicas do teste de micronúcleo são: o efeito do agente químico é observado em PCEs que tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele tenha pode ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; e a freqüência de micronúcleo induzida em PCE é dependente do tempo de amostragem [33].

Tanto ratos como camundongos podem ser utilizados no teste de micronúcleo. No presente trabalho, a espécie *Rattus norvegicus* foi utilizada para a realização dos experimentos em virtude de terem sido feito anteriormente testes de cicatrização com géis contendo diferentes concentrações de própolis nesta espécie

[51]. Segundo Abramsson–Zetterberg et al. (1999) [40], desde que ratos têm sido usados como espécie modelo em estudos toxicológicos convencionais, podem ter uma vantagem se o teste de micronúcleo for usado em paralelo como uma indicação de efeito mutagênico nesta espécie. No caso de uma exposição prolongada de ratos, o qual é comum em testes toxicológicos, seria possível pegar do mesmo animal várias amostras de sangue periférico para o teste de micronúcleo. A análise de células micronucleadas em amostras de sangue periférico obtida de vários tempos durante o experimento fornece uma importante informação suplementar sobre o tempo decorrido da indução de micronúcleo.

Entretanto, Schelgel e MacGregor (1984) [55] mostraram que ratos eliminam PCEMNs do sangue periférico e que o órgão eficaz neste processo é o baço. Dessa forma, eles concluíram que a medula óssea do rato deveria ser usada como uma fonte de eritrócitos para o teste de micronúcleo. A rápida eliminação de PCEMNs de sangue periférico pode diminuir a sensibilidade do teste. Entretanto, a sensibilidade pode ser aumentada pelo uso de PCEs mais jovens para a análise de micronúcleo.

A citometria de fluxo é uma técnica de medição das propriedades óticas das células individuais, ou partículas em geral, em fluxo contínuo passando uma de cada vez, sequencialmente, em frente a um feixe laser com sensores para medir fluorescência e dispersão de luz, identificando o DNA presente dentro dos micronúcleos. O uso da citometria de fluxo quantifica os PCEMNs e os eritrócitos normocromáticos micronucleados (NCEMNs), aumentando a rapidez das análises, com uma ótima sensibilidade. Abramsson–Zetterberg et al. (1999) [40] usaram a citometria de fluxo em suas análises e relataram que a população de PCE jovens podem ser facilmente identificada. Dessa forma, consideram eritrócitos de sangue periférico de ratos como um bom material para o teste de micronúcleo quando uma metodologia correta é usada.

A coloração com *acridine orange* tem propriedades fluorescentes e afinidade por RNA, permitindo assim um maior contraste para a diferenciação dos eritrócitos [40]. Resultados promissores foram obtidos por Hayashi et al. (1992) [56] que mostraram que coloração supravital de PCEs de sangue periférico com *acridine orange* permite diferenciar os PCEs muito jovens e aqueles mais velhos. Quando restringiram a análise para PCE muito jovens em sangue periférico de ratos, a

indução da frequência de PCEMNs foi maior que quando esta frequência foi calculada a partir de todos PCEs periféricos.

Apesar destas considerações, as vantagens do uso de eritrócitos de sangue periférico de ratos têm encorajado vários estudos de avaliação do potencial mutagênico de substâncias químicas baseados na análise de PCEMNs. Henderson et al. (1993) [57] analisaram a indução de micronúcleos na medula óssea e sangue periférico de ratos Wistar expostos à administração aguda e subcrônica da substância azathioprine. Sewerynek et al. (1996) [58] testaram a relação entre um hormônio produzido pela pineal e os lipopolissacarídeos presentes na superfície das células, com a indução de micronúcleos em PCEs de sangue periférico em ratos. Vijayalaxmi et al. (2001) [59] avaliaram a incidência de micronúcleos em sangue periférico e medula óssea de ratos expostos continuamente por 24 horas a uma radiofrequência de 2450MHz. A indução de micronúcleos após total exposição de ratos à radiação de microondas foi avaliada em PCEs de sangue periférico por Trosic et al. (2002) [60] e Trosic e Busljeta (2006) [61]. Hamanda et al. (2003) [62] relataram a correlação entre a idade e a indução de micronúcleos em sangue periférico de ratos, utilizando a CPA em seu controle positivo. A análise de micronúcleos em sangue periférico de ratos também tem sido empregada em estudos de antimutagenicidade [63; 64]. Assim, o teste de micronúcleo de sangue periférico empregado no presente trabalho tem sido utilizado em vários estudos na área de mutagênese.

A CPA aplicada nos animais do grupo controle positivo é um agente clastogênico que induz principalmente quebras cromossômicas. Dessa forma, os micronúcleos induzidos pela CPA contém fragmentos de cromossômicos acêntricos em maior proporção que micronúcleos induzidos por agentes aneugênicos como a vincristina [40]. A CPA aplicada intraperitonealmente eleva a frequência de micronúcleos em PCE em sangue periférico de animais [65; 66]. Gollapude e MacFadden (1995) [67] e Hayashi et al. (2000) [43] também utilizaram a CPA em seus estudos. Baseando-se nos dados acima, a CPA foi empregada no presente trabalho com parâmetro de adequação do sistema-teste utilizado para verificar o possível efeito clastogênico dos géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura. Como a CPA elevou a frequência de PCEMNs no presente estudo, se os géis contendo diferentes concentrações de própolis fossem substâncias mutagênicas, também seria possível observar níveis aumentados de

PCEMNs nas amostras de sangue periférico dos animais tratados. Os valores encontrados nos grupos tratados com os géis foram semelhantes aos dados obtidos no controle negativo, tanto na exposição subaguda como na subcrônica, revelando a ausência de mutagenicidade.

As rotas de administração da substância-teste são variadas. Pode ser por via oral (gavage), injeções intraperitoneal, intravenosa, por inalação ou aplicação subcutânea. Qualquer forma escolhida é justificada, de acordo como se apresenta a substância-teste. A via de administração adotada neste trabalho foi dérmica, pois esta é a via de exposição humana ao gel para queimadura. Neste sentido, é importante enfatizar que a análise de PCEMNs em sangue periférico é adequada para a análise da mutagenicidade dos géis contendo diferentes concentrações de própolis e administrado dermicamente. D'Souza et al. (2005) [68] observaram efeito mutagênico e citotóxico pela análise de micronúcleo em ratos expostos a um herbicida via dérmica.

Anteriormente a este estudo, foram realizados testes histológicos com estes géis contendo diferentes concentrações de própolis para a comprovação do efeito cicatrizante dos géis sobre os tecidos tratados [51]. A realização deste teste histológico determinou o protocolo usado no presente trabalho, justificando-se então o tipo de lesão realizada nos animais, bem como a via de administração dos géis.

Segundo Hayashi et al. (2000) [43] pelo menos 4 animais e 2000 células analisadas por animal devem ser utilizados para determinar a incidência de eritrócitos imaturos micronucleados. No presente trabalho a amostra possui 5 animais do sexo masculino por grupo de tratamento, sendo analisadas 2000 células por animal.

Assim, os resultados obtidos em sangue periférico de ratos submetidos aos tratamentos dérmicos subagudo e subcrônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis revelaram que estes não apresentaram efeitos mutagênico e nem citotóxico, nas condições utilizadas no presente trabalho.

5.2 SISTEMA-TESTE *IN VITRO*: CÉLULAS DE OVÁRIO DE HAMSTER CHINÊS

Os resultados dos tratamentos em pulso de 3 horas e contínuo mostraram que os géis não aumentaram a freqüência de aberrações cromossômicas em relação ao controle. Segundo Galloway et al. (1994) [47] em caso de resultado negativo no tratamento em pulso de 3 horas, um tratamento contínuo deve ser realizado. Assim o presente trabalho após obter o resultado negativo no tratamento em pulso de 3 horas, realizou o tratamento contínuo. De maneira semelhante, o tratamento por 20 horas com os géis contendo diferentes concentrações de própolis não resultou em um aumento de aberrações cromossômicas comparado ao controle.

Tavares et al. (2006) [69] estudaram em CHO₉ o efeito genotóxico e antigenotóxico da própolis verde. Os resultados mostraram que a própolis apresentou um pequeno, mas significativo aumento na freqüência de aberrações cromossômicas somente na maior concentração utilizada, e por outro lado, foi observado que em baixas concentrações a própolis reduziu significativamente o número de aberrações induzidas pelo agente quimioterápico DXR. Os resultados indicaram, portanto, que a própolis apresenta características de um composto “janus”, ou seja, a própolis é genotóxica em altas concentrações e em baixas concentrações apresenta um efeito quimiopreventivo contra a mutagenicidade induzida pela DXR. Ozkul et al. (2006) [70] também relataram os efeitos genotóxicos da própolis em altas concentrações em linfócitos humanos. Os flavonóides podem ser os componentes responsáveis pela atividade de, mutagenicidade e antimutagenicidade da própolis, atuando como pro-oxidantes ou como antioxidantes, dependendo da concentração.

Sobre o sistema teste empregado no presente trabalho, é importante ressaltar que o teste de aberrações cromossômicas em culturas de células de mamíferos é um dos métodos mais utilizados para a avaliação de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos. Além das culturas de linfócitos do sangue periférico humano, podem ser usadas várias linhagens celulares provenientes de hamster Chinês, como por exemplo, as células CHO, V79, CHL, etc [46]. As células CHO são úteis nos ensaios de aberrações cromossômicas e troca de cromátides-irmãs devido à sua estabilidade, curto tempo de geração, boa caracterização, baixo número de cromossomos e um cariótipo estável [45].

Galloway et al. (1997) [71], comparando testes *in vitro* para a análise de aberrações cromossômicas em células CHO e CHL, testaram nove substâncias químicas diferentes, seguindo um mesmo protocolo, e ambos os tipos celulares

tiveram resultados positivos. Hilliard et al. (1998) [48] avaliaram as frequências de aberrações cromossômicas induzidas por compostos químicos em dois tipos de linhagem celular, CHO e TK6 (linfoblastos humanos), relataram a citotoxicidade e observaram que os resultados “falsos” positivos de frequências de aberrações cromossômicas são mais frequentes em testes com as células TK6 do que nos testes com células CHO.

Miller et al. (1997) [72] coletaram dados fornecidos por quatro companhias farmacêuticas, a partir de ensaios realizados com linhagens celulares de hamster Chinês (CHO-K5, CHO-K1, V79) e linfócitos humanos, cuja comparação entre as frequências de aberrações cromossômicas e de micronúcleos mostrou uma correlação positiva (cerca de 88% de coincidência para 57 compostos testados). Tais resultados indicam a validade dos ensaios e a sensibilidade dos sistemas celulares empregados. Em face do exposto, o sistema-teste utilizado no presente trabalho foi adequado para a avaliação da possível mutagenicidade dos géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura.

Com era esperado as culturas tratadas com DXR, utilizado como controle positivo, apresentaram um aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas em relação ao controle negativo, mostrando assim a sensibilidade do sistema-teste empregado. A DXR possui a capacidade de produzir radicais livres que causam diferentes tipos de danos celulares, incluindo quebras do DNA [73]. A estrutura química da DXR favorece a geração de radicais livres e o composto pode unir-se ao ferro e formar complexos com DNA, induzindo quebra do duplo filamento [74]. Alguns estudos têm demonstrado que o dano oxidativo é provavelmente relacionado à formação de radicais livres, com uma concomitante redução a capacidade antioxidante [75].

Com relação à análise do IM, os resultados do presente trabalho mostraram que os géis contendo diferentes concentrações de própolis não apresentaram efeito citotóxico, exceto o gel contendo 3,6% de própolis que mostrou citotoxicidade no tratamento contínuo. Este mesmo tratamento apresentou um aumento não significativo no número de aberrações cromossômicas. Segundo Galloway et al. (1994) [47] o aumento da osmolaridade do meio de cultura pode induzir a um aumento no número de aberrações cromossômicas. Assim, o aumento na frequência de aberrações cromossômicas deve estar relacionado com a citotoxicidade do gel contendo 3,6% de própolis. Esta citotoxicidade pode ser

explicada em parte pela presença do artepelin C, o componente em maior quantidade no extrato de própolis utilizado nos géis, que tem mostrado atividade citotóxica em ensaios *in vitro* em diferentes linhagens celulares. O efeito citotóxico do artepelin C pode ser atribuído em parte à indução de apoptose causada pela fragmentação do DNA [76].

Enfim, os géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura não apresentaram efeito mutagênico nos dois tempos de tratamento. Entretanto, o gel com 3,6% de própolis apresentou um efeito citotóxico no tratamento contínuo.

Os resultados obtidos no presente estudo contribuem para o melhor entendimento da ação da própolis no organismo humano, e conseqüentemente permitem que os géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura possam ser usados de maneira mais efetiva e com maior segurança em futuras aplicações clínicas.

6. CONCLUSÕES

O estudo sobre a possível mutagenicidade dos géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura em sistemas-testes *in vivo* e *in vitro*, nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

1- As freqüências de PCEMNs obtidas nos animais submetidos aos tratamentos subagudo e subcrônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis não diferem significativamente daquelas observadas nos animais do grupo controle, mostrando assim, ausência de efeito clastogênico;

2- A exposição subcrônica mostrou freqüências de PCEMNs menores em relação ao tratamento subagudo, entretanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas;

3- Os resultados de IDN observados nos tratamentos subagudo e subcrônico mostraram que não houve uma redução significativa da porcentagem de PCEs em relação ao total de eritrócitos em todos os grupos de tratamento quando comparados aos animais do grupo controle, mostrando ausência de citotoxicidade;

4- No tratamento *in vitro*, as culturas tratadas com os géis contendo diferentes concentrações de própolis, em pulso de 3 horas e continuamente, apresentaram freqüência de aberrações cromossômicas que não diferiram estatisticamente daquelas observadas nas culturas controle;

5- Quando comparados os dois tempos de tratamentos, observou-se freqüências de aberrações cromossômicas semelhantes, sendo que o tratamento contínuo com o gel contendo 3,6% de própolis houve um aumento não significativo em relação às culturas tratadas em pulso de 3 horas;

6- A análise de IM nas culturas submetidas ao tratamento de pulso de 3 horas com os géis contendo diferentes concentrações de própolis mostrou ausência de diferença significativa entre as culturas tratadas e seus respectivos controles. No tratamento contínuo, somente as culturas tratadas com gel contendo 3,6% de própolis revelou citotoxicidade, sendo os valores de IM significativamente menores quando comparadas às culturas controle.

REFERÊNCIAS

[1] BLACK, J. M.; MATASSARIN-JACOBS, E. M.; LUKMAN, S. *Enfermagem médico-cirúrgica: uma abordagem Psicofisiológica*. 4^a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; Rio de Janeiro, 1996. v. 2, p.1724-29.

[2] WERNECK, G. L.; REICHENHEIM, M. E. *Paediatric burns and associated risk factors in Rio de Janeiro, Brazil*, v. 23, p. 478-831, 1997.

[3] RUSSO, A. C. *Tratamento das queimaduras*. 2ª ed. São Paulo: Sarvier, 1976, 245p.

[4] HU, R. H.; YU, Y. M.; COSTA, D.; YOUNG, V. R.; RYAN, C. M.; BURKE, J. F.; TOMPKINS, R. G. A rabbit model for metabolic studies after burn injury. *Journal of Surgical Research*, v. 75, n. 2, p. 153-158, 1998.

[5] BERRETTA, A. A. *Desenvolvimento e avaliação de uma forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis para o tratamento de queimaduras*. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

[6] PAAVOLA, A.; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, E.; WAHLSTROM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. *Pharmaceutical Research*, v. 12, p.1997-2002, 1995.

[7] NALBANDIAN R. M.; ENRY, R. L.; BALKO, K. W.; ADAMS, D. V.; NEUMAN, N. R. Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. *Journal of Biomedical Material Research*, v. 21, p.1135-1148, 1987.

[8] BANKOVA V. S. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, p. 29-32, 2005.

[9] SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2, p. 33-38, 2005.

[10] BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, p. 347-363, 1998.

[11] PAMPLONA, B. Própolis, composição e atividades terapêuticas. *Revista Racine*, p. 49-53, 1997.

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

[13] SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M.; MAIA, A. B.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A.; FARIAS, L. M. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 285-289, 2003.

[14] SIMÕES, L. M. C.; GREGORIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulates neutrophils. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 59-65, 2004.

[15] MARCUCCI, M.C. Propolis-chemical composition, biological prospective and therapeutic actives. *Apidologie*, v. 206, p. 83-99, 1995.

[16] BANKOVA V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.

[17] SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*, v. 19, p. 183-188, 2005.

[18] MARCUCCI, M. C. Utilização da própolis na indústria cosmética. *Aerosol e Cosméticos*, v. 19, p. 34-36, 1996.

[19] MARCUCCI, M. C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Topics in Phytochemistry*, v.2, p. 115-121, 1999.

[20] KUMAZAWA S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 51, p. 740-742, 2003.

[21] PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 52, p. 1100-1103, 2004.

[22] PARK, Y. K.; IKEGAKI M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, v. 62, p. 2230-2232, 1998.

[23] BASNKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, v. 8, p. 16-23, 2001.

[24] RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, v. 73, p. S21-S29, 2002.

[25] JENG, S. N.; SHIH, M. K.; KAO, C. M.; LIU, T. Z.; CHEN, S. C. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, p. 893-897, 2000.

[26] GOMEZ-ROMERO, M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; MORENO-TORRES, R.; GARCIA-SALAS, P.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal Separation Science*, v. 4, p. 595-603, 2007.

[27] LEMOS, M.; DE BARROS, M. P.; SOUSA, J. P.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; DE ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 4, p. 603-608, 2007.

[28] CHI-FENG, L.; CHIA-HSIEN, L.; CHUN-CHING, L.; YUN-HO, L.; CHIN-FA, C.; CHAO-KUANG, L.; SOUNG-CHOW, L. Antioxidative natural product protect against econazole-induced liver injuries. *Toxicology*, v. 196, p. 87-93, 2004.

- [29] ITOH, S.; KATOH, M.; FURUHAMA K. *In vivo* photochemical micronucleus induction due to certain quinolone antimicrobial agents in the skin of hairless mice. *Mutation Research*, v. 520, p. 133-139, 2002.
- [30] HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapeutics*, v. 96, p. 67-202, 2002.
- [31] MARQUELE, F. D.; MAMBRO, V. M. D.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M. L.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, p. 455-462, 2005.
- [32] DURAN, N.; KOC, A.; OKSUZ, H.; TAMER, C.; AKAYDIN, Y.; KOZLU, T.; CELIK, M. The protective role of topical propolis on experimental keratitis via nitric oxide levels in rabbits. *Molecular Cellular Biochemistry*, v. 281, p. 153-161, 2006.
- [33] RIBEIRO, L. R. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: MARQUES, E. K.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. (Orgs). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. cap. 7, p. 173-200.
- [34] SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Chemical mutagens. *Principles and methods for their detection*. Vol 4. Ed. A. Hollaender. Plenum Press n. Y. pp 31-53, 1976.
- [35] HEDDLE, J. A.; SALAMONE, M. F. (1981). The micronucleus assay *in vivo*. In: Proceedings of the international Workshop on Short-Term Testes for Chemical

Carcinogens. Stich, H.; san, R. H. C.; eds). Springer-Verlag, New York, pp. 243-249.

[36] CRISWELL, K. A.; KRISHNA, G.; ZIELINSKI, D.; URDA, G. A.; THEISS, J. C.; JUNEAU, P.; BLEAVINS, M. N. Use of acridine orange in: flow cytometric assessment of micronuclei induction. *Mutation Research*, v. 414, p. 63-75, 1998.

[37] ICH (1995) International conference on harmonisation: guidance on genotoxicity. a satandard baterry for genotoxicity testing on pharmaceuticals. Federal register, 62: 472-572.

[38] ROBBIANO, L.; MERETO, E.; MIGLIAZZI; MORANDO, A.; PASTORE, P.; BRANDILLA, G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anesthetics. *Mutation Research*, v. 413, p. 1-6, 1998.

[39] JAGETIA, G. C.; NAYAK, V. Treatment of mice with a novel antineoplastic agent taxol before irradiation increases the frequency of micronuclei in the bone marrow. *Mutation Research*, v. 349, p. 219-227, 1996.

[40] ABRAMSSON-ZETTERBERG, L. A.; GRAWÈ, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. *Mechanisms of Mutagenesis*, v. 423, p. 113-124, 1999.

[41] MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GUOLD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, v. 2, p. 509-514, 1980.

[42] HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MACGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; HENDERSON, L.; FEDYK, J.; WINDEBANK.; SMITH, M. Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute subchronic administration of azathioprine. *Mutation Research*, v. 291, p. 79-85, 1994.

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

[44] YAMAMOTO, K.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Research*, v. 71, p. 127-131, 1980.

[45] SWIERENGA, S. H. H.; HEDDLE, J. A.; SIGAL, E. A.; GILMAN, J. P. W.; BRILLINGER, R. L.; DOUGLAS, G. R.; NESTMANN, E. R. Recommended protocols based in a surgery of current practice in genotoxicity testing laboratories, I. V. Chromosome aberration and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, v. 46, p. 301-322, 1991.

[46] TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidia. In: Ribeiro, L R: Salvadori, D. M. F; Marques, E. K. Mutagênese ambiental, Brasília: Ulbra, p. 151-173, 2003.

[47] GALLOWAY, S. M.; AARDEMA, M. J.; ISHIDATE, Jr. M.; IVETT, J. L.; KIRKLAND, D. J.; MORITA, T.; MOSESSO, P.; SOFUNI, T. Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberrations. *Mutation Research*, v. 312, p. 241-261, 1994.

[48] HILLIARD, C. A.; ARMSTRONG, M. J.; BRADT, C. I.; HILL, R. B.; GREENWOOD, S. K.; GALLOWAY, S. M. Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of non mutagenic chemical and metabolic poison. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 31, p. 316-326, 1998.

[49] KRISNA, G. Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats. *Mutation Research*, v. 456, p. 45-50, 2000.

[50] SCHMOLKA IV. Artificial skin. I. Preparation and properties of pluronic f-127 gels for treatment of burns. *Journal Biomedicine Material Research*, v. 6, p. 571-582, 1972.

[51] BERRETTA, A. A.; HIROOKA, L. B.; LUNARDI, L.; MARCHETTI, J. M. Evaluation of the healing process obtained with the application of gels containing standardized propolis extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (in preparation), 2007.

[52] MERSH-SUNDERMAN, V.; KASSIE, F.; BOHMER, S.; LU, W. Q.; WOHLFAHRTH, R.; SOBEL, R.; BRUNN, H. E.; ELSOHLY, M. A.; ROSS, S. A.; STAHL, T. Extract of *Toxicodendron quercifolium* caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cell of CDI mice. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 1611-1617, 2004.

[53] SAVAGE, J. R. K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *Journal of Medical Genetics*, v. 12, p. 103-122, 1976.

[54] MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TIA, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v. 189, p. 103-112, 1987.

[55] SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J. T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and spenectomized fischer 344 rats: implication for cytogenetic screening. *Mutation Research*, v. 127, p. 169-174, 1984.

[56] HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGI, T.; SUZUKI, T.; ASITA, A. O.; SOFUNI, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin c- and cyclophosphamide treated rats. *Mutation Research*, v. 35, p. 209-213, 1992.

[57] HENDERSON, L.; FEDYK, J.; WINDEBANK, S.; SMITH, M. Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute and subchronic administration of azathioprine. *Mutation Research*, v. 1, n. 291, p. 79-85, 1993.

[58] SEWERYNEK, E.; ORTIZ, G. G.; REITER, R. J.; PABLOS, M. I.; MELCHIORRI, D.; DANIELS, W. M. Lipopolysaccharide- induced DNA damage is greatly reduced in rats treated with the pineal hormone melatonin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 117, p. 183-188, 1996.

[59] VIJAYALAXMI, PICKARD, W. F.; BISHT, K. S.; PRIHODA, T. J.; MELTZ, M. L.; LAREGINA, M. C.; ROTI ROTI, J. L.; STRAUBE, W. L.; MOROS, E. G. Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells of rats exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. *International Journal of Radiations Biology*, v. 11, p. 1109-1115, 2001.

[60] TROSIC, I., BUSLJETA, I., KASUBA, V., ROZGAJ, R. Micronucleus induction after whole-body microwave irradiation of rats. *Mutation Research*, v. 521 73-79, 2002

[61] TROSIC, I.; BUSLJETA, I. Erythropoietic dynamic equilibrium in rats maintained after microwave irradiation. *Experimental and Toxicology Pathology*, v. 3, p. 247-251, 2006.

[62] HAMANDA, S.; NAKAJIMA, K.; SERIKAWA, T.; HAYASHI, M. The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay. *Mutagenesis*, v. 18, p. 273-275, 2003.

[63] APPEL, M. J.; WOUTERSEN, R. A. Effects of a diet high in fish oil (MaxEPA) on the formation of micronucleated erythrocytes in blood and on the number of atypical acinar cell foci induced in rat pancreas by azaserine. *Nutrition and Cancer*, v. 47, p. 57-61, 2003.

[64] SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. *Archives of Toxicology*, v. 80, p. 115-119, 2006.

[65] CZYZEWSKA, A.; MAZUR, L. Suppressing effect of WR-2721 on micronuclei induced by cyclophosphamide in mice. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, v. 15, p. 109-114, 1995.

[66] SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. *Archives of Toxicology*, v. 2, p. 115-119, 2006.

[67] GOLLAPUDI, B. B.; MACFADDEN, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Research*, v. 347, p. 97-99, 1995.

[68] D'SOUZA, U.J.; ZAIN, A.; RAJU, S. Genotoxic and cytotoxic effects in the bone marrow of rats exposed to a low dose of paraquat via the dermal route. *Mutation Research*, v. 581, p.187-190, 2005.

[69] TAVARES D. C.; BARCELOS, G. R. M.; SILVA, L. F.; TONIN, C. C. C.; BASTOS, J. K. Propolis-induces genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in vitro*, v. 20, p. 1154-1158, 2006.

[70] OZKUL, Y.; EROGLU, H. E.; OK, E. Genotoxic potential of Turkish propolis in peripheral blood lymphocytes. *Pharmazie*, v 61, p. 638-640, 2006.

[71] GALLOWAY, S. M.; SOFUNI, T.; SHELBY, M. D.; THILAGAR, A.; KUMAROO, V.; KAUR, P.; GULATI, D.; PUTMAN, D. L.; MURLI, H.; MARSHALL, R.; TANAKA, N.; ANDERSON, B.; ZEIGER, E.; ISHIDATE, M. Jr. Multilaboratory comparison of *in*

in vitro tests for chromosome aberrations in CHO and CHL cells tested under the same protocols. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 29, p. 289-207, 1997.

[72] MILLER, B.; ALBERTINI, S.; LOUCHER, F.; THYBAUD, V.; LORGE, E. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research*, v. 392, p. 45-59, 187-208, 1997.

[73] KEIZER, H.G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology Therapy*, v. 47, p. 219-231, 1990.

[74] ELIOT, H. I.; GIANNI, L.; MYERS, C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. *Biochemistry*, v. 23, p. 928-936, 1984.

[75] MYERS C. E.; MCGUIRE, W. P.; LISS, R. H.; IFRIM, I.; GROTZINGER, K.; YOUNG, R. C. Adriamycin: the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, v. 197, p.165-167, 1997.

[76] SUGIMOTO, Y.; IBA, Y.; KAYASUGA, R.; KIRINO, Y.; NISHIGA, M.; HOSSEN, M. A.; OKIHARA, K.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H.; KAMEI, C. Inhibitory effects of propolis granular A. P. C on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. *Cancer Letters*, v.193, p. 155-159, 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)