

Própolis verde brasileira: citotoxicidade e potencial anti-inflamatório in vitro

Brazilian green propolis: cytotoxicity and anti-inflammatory potential in vitro

DOI:10.34117/bjdv8n11-394

Recebimento dos originais: 28/10/2022

Aceitação para publicação: 30/11/2022

Camila de Almeida Pimentel

Graduanda em Engenharia Biotecnológica

Instituição: Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis - SP,

CEP: 19806-900

E-mail: camila.pimentel@unesp.br

Julia Amanda Rodrigues Fracasso

Mestranda em Ciências Biomateriais

Instituição: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Rod. Mal. Rondon, s/n, Jardim Nova York, Araçatuba - SP,

CEP: 16066-840

E-mail: j.fracasso@unesp.br

Luísa Taynara Silvério da Costa

Doutoranda em Ciências Biomateriais

Instituição: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Endereço: Rod. Mal. Rondon, s/n, Jardim Nova York, Araçatuba - SP,

CEP: 16066-840

E-mail: luisa.silverio@unesp.br

Fernando Yutaka de Ferreira

Graduando em Engenharia Biotecnológica pela Universidade

Estadual Paulista (UNESP)

Instituição: Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis - SP, CEP: 19806-900

E-mail: fernando.yutaka@unesp.br

Lucas Pires Guarnier

Doutorando em Genética pela Universidade de São Paulo (USP)

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
(FMRP - USP)

Endereço: Av. Bandeirantes, 3900, Campus da USP, Ribeirão Preto - SP,

CEP: 14049-900

E-mail: lucasguarnier@usp.br

Giovana Sant'Ana Pegorin Brasil

Doutoranda em Biotecnologia pelo Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista

Endereço: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Endereço: Av. Prof. Francisco Degni, 55, Jardim Quitandinha, Araraquara - SP,
CEP: 14800-900

e-mail: giovanapegorin@gmail.com

Andresa Berretta

Ph.D. em Ciências Farmacêuticas

Instituição: Empresa Apis Flora

Endereço: R. Triunfo, 945, Subsetor Sul - 3, (S-3), Ribeirão Preto - SP,
CEP: 14020-670

E-mail: andresa.berretta@apisflora.com.br

Lucinéia dos Santos

PhD. em Ciências Psicobiologia pela Universidade de São Paulo (USP)

Instituição: Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100, Parque Universitário, Assis - SP, CEP: 19806-900

E-mail: lucineia.santos@unesp.br

RESUMO

A manutenção prolongada de uma resposta inflamatória eleva o risco de desenvolvimento de um processo crônico, bem como, promove a ocorrência de dano tecidual severo. A propólis verde, produzida a partir de exsudatos coletados pelas abelhas africanizadas de uma planta nativa do Brasil, detém de composição fitoquímica as quais são responsáveis por atividades biológicas benéficas ao organismo no combate e prevenção de doenças. Diante do cenário da busca por compostos terapêuticos com capacidade anti-inflamatória segura e eficiente, este estudo teve como objetivo investigar *in vitro* o potencial anti-inflamatório e citotóxico do extrato da própolis verde (EPV). Para tanto, realizou-se a análise fitoquímica por meio da quantificação de flavonoides, taninos condensados, taninos hidrolisados e saponinas. A análise de citotoxicidade foi realizada por meio do ensaio do MTT, e os ensaios de fagocitose e espraiamento de macrófagos para a análise da atividade anti-inflamatória. Observou-se que o EPV possui elevados teores de flavonoides (7.2 ± 0.48 em g EQ/100g), taninos condensados (32.28 ± 9.5 em g EP/100g), taninos hidrolisados (67.87 ± 10.04 em g EAG/100g) e saponinas (71.31 ± 7.9 em g ES/100g). A ausência de citotoxicidade foi constatada em todos os tempos de avaliação por meio do cálculo da concentração citotóxica de 50% (CC50). Os valores obtidos de CC50 foram: tempo de 24 h - 2393 $\mu\text{g/mL}$, tempo de 48 h - 8665 $\mu\text{g/mL}$ e no tempo de 72 h - 6027 $\mu\text{g/mL}$. Nas análises anti-inflamatórias *in vitro*, os tratamentos promoveram inibições de 92 a 100% nas concentrações de 200, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, tanto no teste de espraiamento como no de fagocitose. A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que a ausência de citotoxicidade e atividade anti-inflamatória do EPV podem ser comprovadas por estudos *in vitro*, e que, provavelmente, além dos compostos fenólicos, as saponinas estejam respondendo por essa importante atividade terapêutica.

Palavras-chave: abelhas africanizadas, vassourinha, fagocitose, compostos fenólicos, saponinas.

ABSTRACT

The prolonged maintenance of an inflammatory response increases the risk of developing a chronic process, as well as, promotes the occurrence of severe tissue damage. Green propolis, produced from exudates collected by Africanized bees from a plant native to Brazil, has a phytochemical composition which is responsible for biological activities that are beneficial to the organism in combating and preventing diseases. Given the search for therapeutic compounds with safe and efficient anti-inflammatory capacity, this study aimed to investigate *in vitro* the anti-inflammatory and cytotoxic potential of green propolis extract (EPV). To this end, phytochemical analysis was performed by quantifying flavonoids, condensed tannins, hydrolyzed tannins, and saponins. Cytotoxicity analysis was performed using the MTT assay, and phagocytosis and macrophage spreading assays for the analysis of anti-inflammatory activity. It was observed that EPV has high contents of flavonoids (7.2 ± 0.48 in g EQ/100g), condensed tannins (32.28 ± 9.5 in g EP/100g), hydrolyzed tannins (67.87 ± 10.04 in g EAG/100g) and saponins (71.31 ± 7.9 in g ES/100g). The absence of cytotoxicity was verified at all evaluation times by calculating the 50% cytotoxic concentration (CC50). The obtained CC50 values were: 24 h time - 2393 $\mu\text{g/mL}$, 48 h time - 8665 $\mu\text{g/mL}$ and at 72 h time - 6027 $\mu\text{g/mL}$. In the *in vitro* anti-inflammatory analyses, the treatments promoted inhibitions from 92 to 100% in concentrations of 200, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$, both in the spreading test and in the phagocytosis test. From the results obtained, it is possible to conclude that the absence of cytotoxicity and anti-inflammatory activity of EPV can be proven by *in vitro* studies, and that, probably, besides phenolic compounds, saponins are responsible for this important therapeutic activity.

Keywords: africanized honeybees, broombee, phagocytosis, phenolic compounds, saponins.

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma condição essencial no processo de cicatrização dentro do organismo, mediando o reparo tecidual com a proliferação de queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e recrutamento de macrófagos (Boniakowski et al., 2017). Os macrófagos agem diretamente em injúrias no organismo humano, incluindo defesa do hospedeiro, promoção e resolução da inflamação, remoção de células apoptóticas e suporte da proliferação celular, além da restauração do tecido pós lesão (Koh TJ, DiPietro, 2011). Entretanto, este processo, quando fora do estado de homeostasia, prejudica a reparação tecidual plena, em razão do aumento de citocinas pró-inflamatórias (Snyder et al., 2016). Desta maneira, o descontrole e a perpetuação da resposta inflamatória elevam o risco de desenvolvimento de ferimentos crônicos (Brancato; Albina, 2011), podendo gerar úlceras em função do estresse oxidativo, da dispersão de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da ação de enzimas proteolíticas secretadas pelos macrófagos (Ganesh; Ramkumar, 2020).

Nos últimos anos, com o propósito de reduzir os danos teciduais, promover a adequada cicatrização e a remissão da inflamação descontrolada, tem se intensificado a investigação de novas moléculas ativas que possam substituir os anti-inflamatórios sintéticos não esteroidais (AINEs). O mecanismo de ação dos AINEs tradicionais fundamenta-se na inibição da ciclooxigenase 2 (COX-2), enzima responsável pela biossíntese das prostaglandinas e do tromboxano, que realizam a mediação da inflamação e a dor (Bacchi et al., 2012). Entretanto, vários estudos mostram que os AINEs não atuam de forma seletiva na via da COX-2, mas também na via da COX-1, responsável pela produção de prostaglandinas que são importantes na função gastrointestinal e renal. Sendo assim, a redução dessas prostaglandinas pode ocasionar danos a essas funções (Bertolini A, Ottani A, Sandrini, 2002; Ogazon et al., 2021; Kaduševičius, 2021). Desse modo, as gastroenteropatias induzidas por AINEs podem variar desde petéquias, até mesmo complicações graves, como hemorragia, ulceração e morte (Marcén; Sostres; Lanas, 2016).

Nessa direção, a propólis, um produto formado quando as abelhas utilizam a saliva para coletar material de brotos, flores e plantas, transformando-os em uma resina; apresenta-se como candidato potencial na busca de novos princípios ativos, moléculas e classes de bioativos que corroborem com a diminuição da inflamação, consequentemente auxilie na regeneração tecidual. Destaca-se, assim, a propólis verde, encontrada nos estados de São Paulo e Minas Gerais, sendo produzida por abelhas *Apis mellifera* a partir de uma planta nativa do Brasil, *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como Vassourinha ou Alecrim do Campo (Augusto-Obara et al., 2019). Esta possui uma composição característica, contendo elevados níveis em polifenóis (principalmente flavonoides), saponinas, ceras, resinas, bálsamos, aminoácidos e outros óleos (Tobaldini-Valerio et al., 2016; Moskwa et al., 2020; Pereira et al., 2021); que lhe conferem propriedades terapêuticas promissoras, como antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antiviral, imunomoduladora, cicatrizante e antisséptica (Righi et al., 2011).

Enfim, contemplando os aspectos fundamentados, e se utilizando somente de ensaios realizados *in vitro*, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial anti-inflamatório e citotóxico do extrato da propólis verde (EPV). Além disso, por meio das quantificações de seus metabólitos secundários, estabelecer uma correlação entre a composição fitoquímica do EPV e sua atividade anti-inflamatória.

2 METODOLOGIA

O extrato da própolis foi obtido a partir da própolis padronizada (Número da patente PI 0405483-0, Revista de Propriedade Industrial, n. 1778, 2005) fornecida pela empresa Apis Flora Industrial e Comercial Ltda. Para a obtenção do extrato da própolis efetuou-se a maceração da própolis com uma solução hidroalcoólica de 30% própolis 70% álcool PA (v/v). Em seguida, a solução foi filtrada e o extrato foi concentrado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida e temperatura controlada de 40-60°C para eliminação completa do etanol. Ao extrato foi adicionada água purificada e a solução foi submetida a uma operação de secagem na presença de maltodextrina (7:3, própolis: excipiente) por spray, obtendo o extrato da própolis verde (EPV).

A quantidade de flavonoides foi determinada usando um método espectrofotométrico baseado na formação de complexos de flavonoides com íons Al^{3+} (Peršurić et al., 2020). Primeiro, 1 mL dos tratamentos (100 a 1000 μ g/mL) foi misturado com 0.3 mL de $NaNO_2$ (5%, m/v) e 0.5 mL de $AlCl_3$ (2%, m/v). Após 6 min, a amostra foi neutralizada com 0.5 mL de solução de $NaOH$ 1 mol/L. A mistura foi deixada por 10 min à temperatura ambiente e, em seguida, a absorbância foi medida a 510 nm usando espectrofotômetro Lambada Bio 20 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em g equivalente de quercetina (EQ) por 100 g de extrato seco (g EQ/100 g).

O conteúdo de taninos condensados foi analisado pela metodologia descrita por Martins (2019), por meio de reação colorimétrica com solução de vanilina. Em tubos de ensaios pré-aquecidos a 30 °C por 30 min foram adicionados 1.0 mL dos extratos dissolvidos em álcool etílico PA, 2.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 25% em álcool etílico PA (v/v) e 2.5 mL de vanilina 1% em álcool etílico PA (p/v). Os tubos foram agitados em vórtex para homogeneização e aquecidos por 20 minutos a 30 °C em banho-maria, ao abrigo da luz. Em seguida, a leitura em espectrofotômetro foi a 500 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de proantocianidina (EP) em g/100 g de extrato seco.

O conteúdo de taninos hidrolisáveis foi estimado em espectrofotômetro de acordo com a metodologia adaptada por Garcia et al. (2011). Em tubos de ensaio 2 mL das amostras foram misturados com 8 mL da solução reagente contendo sulfato de amônio férrico (FAS), que consiste em 89% de solução 50% (m/v) ureia/tampão acetato 0.1 M pH 4.4, 10% de solução de goma arábica 1% em água destilada e 1% da solução de sulfato

de amônio férrico em ácido clorídrico 1M. Após 20 min de reação, a absorbância foi lida em 580 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) em g/100 g de extrato seco.

O teor de saponinas totais foi determinado usando um método espectrofotométrico de acordo com Shiau et al. (2009), com algumas modificações. Em tubos de ensaio foram pipetados 0.25 mL dos tratamentos (100 a 1000 µg/mL), 0.25 mL de reagente vanilina 10% (m/v) e 2.5 mL de H₂SO₄ 72% (v/v) em banho de gelo a 4 °C. Após, a mistura foi aquecida em banho-maria por 10 min a 60 °C e, posteriormente, resfriada a 25°C. A absorbância da mistura foi medida a um comprimento de onda de 544 nm usando espectrofotômetro Lambda Bio 20 (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA). Os resultados foram expressos em g equivalente de saponinas (ES) por 100 g de extrato seco (g ES/100 g).

O ensaio de citotoxicidade do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] foi realizado conforme descrito anteriormente por Mosmann (1983), com algumas modificações (Tsuboy et al., 2010). Para este ensaio, fibroblastos de camundongos de origem dérmica (NIH/3T3, ATCC® CRL-1658™) foram semeados em placas de 96 poços e incubados por um período de 24 h a 37 °C, 5% CO₂. Após uma confluência de aproximadamente 75% (24 h), essas células foram expostas a cinco concentrações diferentes de EPV (100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 800 µg/mL e 1600 µg/mL), ao controle negativo (solução fisiológica) e ao controle positivo (2% (v/v) Tween 80). O tempo de tratamento foi de 24, 48 e 72 h. A concentração citotóxica de 50% (CC50) foi definida como a concentração de extrato/composto necessária para a redução da viabilidade celular pela metade (OGBOLE et al., 2017), e sua interpretação foi baseada nos estudos de Silva-Silva (2016): resultado menor ou igual a 100 µg/mL (citotóxico), entre 101-500 µg/mL (moderadamente citotóxico) e acima de 500 µg/mL (não citotóxico).

Para a determinação da atividade anti-inflamatória foram utilizados os seguintes tratamentos 200, 500 e 1000 µg/mL. A cultura celular foi realizada com macrófagos murinos da linhagem imortalizada Raw 264.7 (ATCC TIB-71), os quais foram descongelados e cultivados em um frasco de cultura de células com meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) Ham's F-12 a 37 °C, 5% de CO₂.

O primeiro teste realizado *in vitro* foi espreiamento de macrófagos, seguindo o método descrito por Basto et al. (2012). As lâminas foram fixadas com glutaraldeído

2.5%, posteriormente foram coradas com corante Wright (Renylab), com as lâminas prontas, foram lidas as triplicadas em microscópio óptico com aumento de 400 x, totalizando 100 células. A inibição de espraiamento (IE) foi calculada usando a seguinte fórmula:

Equação 1. %Inibição do Espraiamento de Macrófagos

$$IE (\%) = \frac{E_0 - E_T}{E_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde E_0 representa o valor médio do número de células espraiadas no grupo controle negativo; E_T representa o valor médio do número de células espraiadas nos grupos tratados.

O segundo teste anti-inflamatório realizado *in vitro* foi a fagocitose, seguindo o método descrito por Azedo et al. (2011), com poucas modificações. As lâminas foram fixadas com glutaraldeído 2.5%, posteriormente foram coradas com corante Wright (Renylab), com as lâminas prontas, foram lidas em triplicata em microscópio óptico com aumento de 400 x, realizando uma contagem total de 100 células. A inibição da fagocitose (IF) foi calculada usando a seguinte fórmula:

Equação 2. %Inibição da Fagocitose de Macrófagos

$$IF (\%) = \frac{E_0 - E_T}{E_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde: E_0 representa o valor médio do número de células no grupo de controle negativo que fagocitaram as partículas de Zymosan; E_T representa o valor médio do número de células dos grupos tratados que fagocitaram as partículas de Zymosan.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição polifenólica e de saponinas encontrada para o extrato da própolis verde (EPV):

Tabela 1. Média \pm DP de flavonoides, taninos condensados, taninos hidrolisados e saponinas presentes no extrato da própolis verde (EPV). Resultados expressos em gramas equivalentes do padrão para 100 g do extrato seco.

Flavonoides	7.26 \pm 0.48 em g EQ/100g
Taninos Condensados	26.18 \pm 0.02 em g EP/100g
Taninos Hidrolisáveis	59.84 \pm 0.02 em g EAG/100g
Saponinas	71.31 \pm 7.9 em g ES/100g

EQ - equivalente de quercetina em g/100 g de extrato seco; EP - equivalente de proantocianidina em g/100 g de extrato seco; EAG - equivalente de ácido gálico em g/100 g de extrato seco; ES - equivalente de saponinas padrão em g/100 g de extrato seco.

Os valores de bioativos na própolis variam muito de acordo com a sazonalidade e localidade da própolis e a fonte botânica usada na sua produção pela abelha (Wozniak, 2019). Nunes et al. (2012) quantificaram no extrato hidroalcolólico da própolis verde e este apresentou 6.048% (m/m) de flavonoides totais. Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência os mesmos autores identificaram altas concentrações de ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico, ácido diprenil-hidroxicinâmico e derivados do ácido cinâmico), os quais são atribuídas as propriedades antibacteriana, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória.

Os taninos condensados e hidrolisáveis são comumente encontrados em diferentes tipos de própolis (LUSTOSA et al., 2008). São constituídos por polifenóis e classificados em hidrolisáveis e condensados, exercem função antioxidante, inibidores enzimáticos, antimicrobiana e cicatrização de feridas (Lobo, 2017). Oliveira e Momesso (2019) por meio de triagem qualitativa de taninos condensados e hidrolisáveis, constataram a presença de ambos. Oliveira et al. (2012) e Nogueira (2017) também apresentaram qualitativamente a presença deste metabolito secundário. Entretanto, foi observado durante a triagem de dados, que não há relatos fitoquímicos da dosagem quantitativa de taninos presentes na própolis verde.

As saponinas provenientes de fontes naturais são usadas há séculos em medicamentos fitoterápicos e infusões de plantas, são moléculas anfifílicas que consistem em carboidratos e porções de aglicona triterpenóide ou esteróide – possuem múltiplas atividades biológicas, como efeitos fungicidas, antimicrobianos, antivirais, anti-inflamatórios, anticancerígenos, antioxidantes e imunomoduladores (Juang; Liang, 2020). A presença de saponinas na própolis verde é relatada por Araújo et al. (2020) pela análise qualitativa, sendo a formulação do extrato metanólico que demonstrou presença deste metabolito secundário na própolis produzida pelas abelhas da cidade de Salinópolis, estado do Pará, Brasil. Nogueira (2017) também por análise qualitativa indicando presença e identificação de saponinas. Deste modo, foi observado durante a triagem de

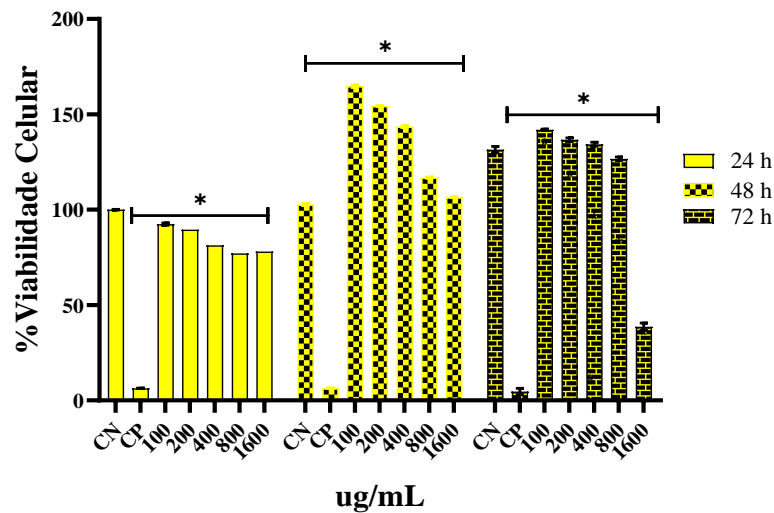
dados, que não há relatos fitoquímicos da dosagem quantitativa de saponinas presentes na própolis verde.

A fim de comprovar a ausência de citotoxicidade e segurança de seu uso, o EPV foi avaliado pelo método MTT. Neste teste, a viabilidade das células NIH3T3 foi comprovada por meio da formação dos cristais de formazan. De acordo com ISO10993-5 para ensaios de citotoxicidade *in vitro*, a viabilidade deve ser superior a 70% para que a amostra não apresente potencial citotóxico (ISO, 2009). Na Figura 1 observa-se a análise da citotoxicidade dos tratamentos com o EPV, do controle positivo (Tween 80%) e do controle negativo (solução fisiológica) nos tempos de 24, 48 e 72 h. Foi constatado, a partir dos dados obtidos, que todos os tratamentos com o EPV e controle positivo apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (solução fisiológica), $p < 0.05$. O controle positivo apresentou citotoxicidade em todos os tempos analisados, pois reduziu a viabilidade em menos de 70%. No tempo de 24 h todas concentrações do EPV reduziram a viabilidade celular, mas esta se manteve superior a 70% ($p < 0.05$). Em 48 h, todos os tratamentos com EPV aumentaram a viabilidade celular em relação ao controle negativo ($p < 0.05$). No tempo de 72 h, somente a concentração de 1600 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou-se citotóxica, pois apresentou uma viabilidade de 38.68%, $p < 0.05$. Observa-se, portanto, que nos tempos de 48 e 72 horas de tratamento, o EPV, exceto na dose de 1.600 $\mu\text{g/mL}$, promoveu o aumento na proliferação celular, demonstrando um maior metabolismo das mitocôndrias das células.

A partir dos dados obtidos foi calculada a concentração citotóxica de 50% (CC50), definida como a concentração de EPV necessária para reduzir a viabilidade celular pela metade (Ogbole et al., 2017). Os valores obtidos de CC50 foram: tempo de 24 h - 2393 $\mu\text{g/mL}$, tempo de 48 h - 8665 $\mu\text{g/mL}$ e no tempo de 72 h - 6027 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com a classificação de Silva-Silva (2016) em todos os tempos analisados o EPV se enquadra como uma substância não citotóxica.

Peter et al. (2019) avaliaram o extrato hidroalcoólico da própolis verde em células MDBK (células saudáveis de fígado) nas concentrações de 0.097 a 0.39 mg/mL e também constatou ausência de citotoxicidade. Em adição, Nogueira (2017) avaliou o extrato hidroalcoólico da própolis verde em células mononucleares humana nas concentrações 0.5%, 1%, 5% e 10% e em tempos de incubação de e 24, 48 e 72h, notando que a viabilidade celular foi de 100%.

Figura 1. Média \pm DP dos valores em % referente a taxa de viabilidade celular em fibroblastos NIH 3T3 nos diferentes tempos de avaliação (24, 48 e 72 h) após a realização dos seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Tween 80 a 2% - controle positivo (CP); Extrato da própolis verde nas concentrações de 100, 200, 400, 800 e 1600 $\mu\text{g/mL}$. O asterisco (*) significa $p < 0.05$ diferença significativa em relação ao grupo CN.



Posteriormente, após a comprovação da ausência da citotoxicidade, foi avaliada a atividade anti-inflamatória *in vitro* promovida pelo EPV. Sabe-se que os macrófagos, principais células responsáveis pela resposta imune, respondem rapidamente a sinais microambientais, incluindo os gradientes de sinais físicos ou químicos, que podem modular o seu comportamento celular, promovendo polarização, proliferação e adesão (Li; Batlie, 2021). Assim, o desequilíbrio na homeostase dos macrófagos se constitui em um dos principais fatores para a liberação de mediadores pró-inflamatórios, resultando na ativação contínua de populações imunes e estromais, na diminuição da regeneração do tecido e no aceleração dos processos de necrose tecidual (Ross; Devitt; Johnson, 2021).

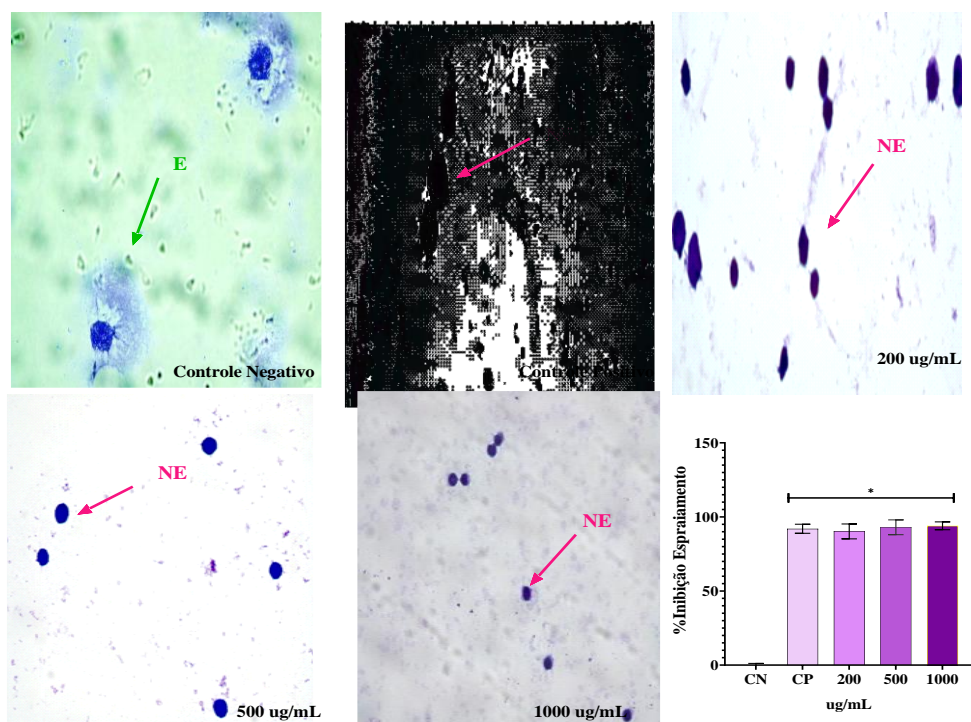
A Figura 2 apresenta as células espaiadas (E) no CN (controle negativo) e células não espaiadas (NE) após tratamento com EPV. A partir da contagem de células E e NE em todas as lâminas e do cálculo da porcentagem de inibição do espriamento foram obtidos os seguintes resultados para os tratamentos com EPV nas diferentes concentrações analisadas: 200 $\mu\text{g/mL}$ – 90.22 \pm 3.05 %; 500 $\mu\text{g/mL}$ – 93.00 \pm 5 % e 1000 $\mu\text{g/mL}$ – 94.00 \pm 2.64%. O CP (controle positivo) inibiu o espriamento em 92.03 \pm 3.55%. O extrato em todas as concentrações analisadas e o CP diferiram do CN de forma significativa ($p < 0.05$).

Na literatura não existem relatos de estudos realizados com a própolis verde neste teste. Mas, Kienzl et al. (2020) analisando as concentrações de 10 ou 5 μg de THC (Tetrahydrocannabinol) observaram uma inibição de 100% do espriamento de

macrófagos. Friedman et al. (1983) constataram que o extrato sonificado de *L. pneumofilha*, 10 ug/mL promoveu uma inibição de 89.2% do espraiamento.

O espraiamento representa um processo importante no processo inflamatório. A mudança de morfologia do macrófago permite, por meio dos pseudópodes, que este atinja o local da injúria e/ou patógeno (Boniakowski et al., 2017). Desta forma, por inibir o espraiamento em todas as concentrações analisadas, inclusive apresentando um efeito semelhante ao do controle positivo, os resultados obtidos com o EPV neste teste se mostram promissores.

Figura 2. Médias \pm DP dos valores em % da Inibição do Espraiamento em macrófago RAW 264 após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Dexametasona 100 μ g/mL - controle positivo (CP) e extrato da própolis verde (EPV) nas concentrações de 200, 500 e 1000 μ g/mL. O asterisco (*) significa $p < 0.05$ significa diferença significativa em relação ao grupo CN.

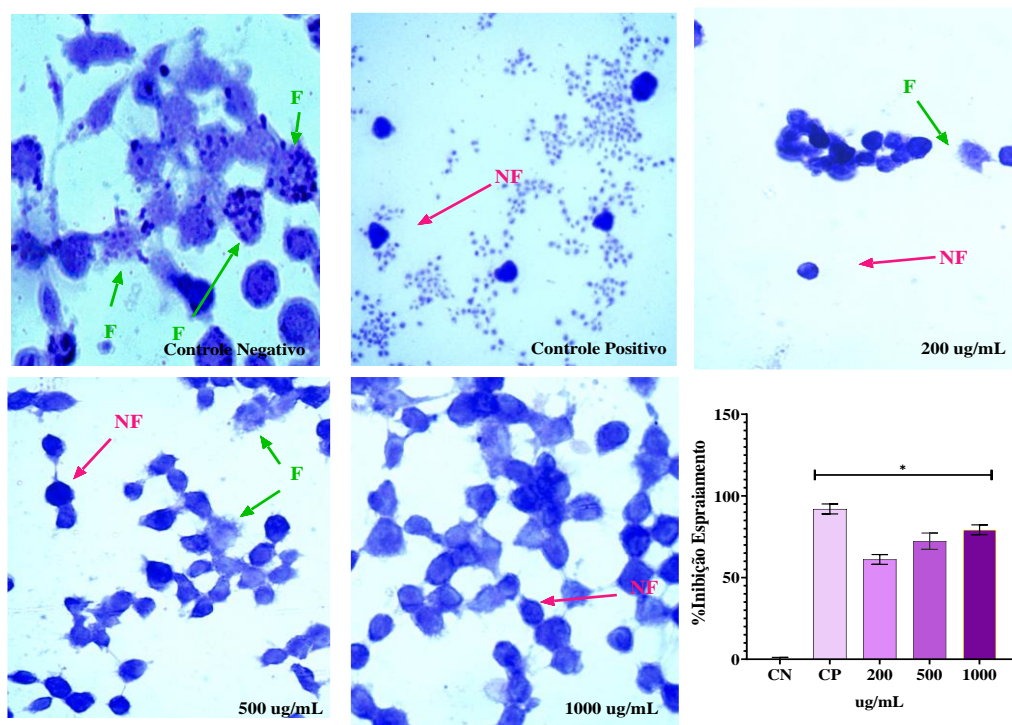


Os macrófagos também participam da alça autorreguladora no processo inflamatório, produzindo uma ampla gama de moléculas biologicamente ativas, participando de resultados benéficos e prejudiciais na inflamação, como, por exemplo, a fagocitose desenfreada (Gierlikowska et al., 2020). A fagocitose pode ser desencadeada por diversas interações receptor-ligante para eliminar patógenos, autofagia e doenças autoimunes (Joffe et al., 2020).

Na Figura 3 estão representados macrófagos que realizaram o processo de fagocitose (F) e macrófago que não realizaram fagocitose (NF). Os resultados mostram,

que em todas as concentrações analisadas o EPV diferiu significativamente do controle negativo $p < 0.05$. A inibição do processo de fagocitose em % foram: 200 $\mu\text{g/mL}$ - 61.80 ± 3.00 ; 500 $\mu\text{g/mL}$ 72.90 ± 5.03 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ - 79.80 ± 3.44 . O controle positivo (dexametasona 100 $\mu\text{g/mL}$) promoveu, em %, $92,03 \pm 4.66$ de inibição.

Figura 3. Média \pm DP dos valores em % referente a inibição da fagocitose em macrófago RAW 264 após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Dexametasona 100 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo (CP); extrato da própolis verde (EPV). O asterisco (*) significa $p < 0.05$ significa diferença significativa em relação ao grupo CN.



Do mesmo modo que o observado para o ensaio de espalhamento, não foram encontrados na literatura estudos realizados com a própolis verde neste teste. No entanto, se utilizando desse teste Hikmah et al. (2015) analisaram o extrato metanólico de *Annona muricata* e de *Orthosiphon aristatus*, ambos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, e obtiveram, respectivamente, as seguintes % de inibição da fagocitose: 58.43 ± 1.93 e 57.72 ± 1.05 . No estudo realizado por Ramesh e Padmavathi (2010) com ratos da linhagem Wistar *in vivo*, o extrato etanólico de *Euphorbia hirta* diminuiu o índice fagocitário em 100% dos macrófagos peritoneais estimulados nas concentrações de 40 mg/kg.

Em um estudo realizado por Machado et al. (2012) foi demonstrado que o extrato aquoso de própolis verde tem um forte potencial anti-inflamatório em modelo pulmonar e granulomatoso em animais. Também, é capaz de promover a inibição de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias sugerindo uma atividade

imunomoduladora. Ainda, para os autores, os compostos fenólicos estão entre os componentes mais proeminentes da própolis, e são considerados responsáveis pela maior parte de suas propriedades.

Em consonância a este estudo realizado *in vivo*, com o extrato aquoso da própolis verde, nossos resultados, obtidos em testes *in vitro*, também demonstram expressiva atividade anti-inflamatória do extrato alcoólico da própolis verde. Porém, os dados obtidos nesse estudo sugerem que além dos compostos fenólicos as saponinas devem estar contribuindo fortemente com a atividade biológica apresentada pelo EPV.

4 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, foi possível constatar no EPV a presença de compostos fenólicos, como os flavonoides e taninos, bem como uma expressiva concentração de saponinas. Por meio do cálculo do CC50 foi possível classificar o EPV como não citotóxico. A atividade anti-inflamatória *in vitro* do EPV foi constatada por sua capacidade em inibir o espriamento e a fagocitose de macrófagos. Dessa forma, é possível estabelecer uma relação entre a atividade terapêutica do EPV com os metabólitos secundários analisados, em especial as saponinas.

REFERÊNCIAS

ANANTHI, T.; CHITRA, M. Screening of invitro anti-inflammatory activity of *Michelia champaca* Linn. Flowers. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, p. 71–72, 2013.

Araújo, A. B. C.; Dias, A. J. S.; Freitas, R. L. S.; Nunes, A. R.; Silva, G. A.; Santos, D. C. Prospecção Química e Avaliação da Atividade Biológica da Própolis de Salinópolis, Pará. **Rev. Virtual Quim.**, 12 (2), 00-00, 2020.

ApisFlora. Processo de obtenção do extrato padronizado de própolis, extrato assim obtido, suas formulações, produtos e usos". Depósito de patente sob o número PI0405483-0, publicado na Revista de Propriedade Industrial n. 1778, de 01/02/2005.

AUGUSTO-OBARA, T. R. et al. Benefits of superfine grinding method on antioxidant and antifungal characteristic of Brazilian green propolis extract. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 398–404, 2019.

AZEDO, M. R. et al. Functional evaluation of monocytes in cattle naturally infected with the bovine leucosis virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 1131–1140, 2011.

BACCHI, S. et al. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 52–64, 2012.

BARBA-OSTRIA, C. et al. Evaluation of Biological Activity of Natural Compounds: Current Trends and Methods. **Molecules**, v. 27, n. 14, p. 4490, jan. 2022.

BASTOS, C. R. et al. Viabilidade celular, fagocitose e espraçamento de fagócitos mononucleares, e liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos de glândulas mamárias bovinas sadias e infectadas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 850–854, set. 2012.

BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 10, p. 1033–1043, maio 2002.

BONIAKOWSKI, A. E. et al. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 199, n. 1, p. 17–24, 1 jul. 2017.

BRANCATO, S. K.; ALBINA, J. E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 1, p. 19–25, jan. 2011.

EL-BELTAGI, H. S. et al. Physical Characteristics, Mineral Content, and Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* or *Citrus sinensis* Peel Extracts and Their Applications to Improve Cake Quality. **Plants**, v. 11, n. 13, p. 1740, jan. 2022.

FRIEDMAN, M.; KLEIN, T. W.; FRIEDMAN, H. Legionella pneumophila-induced suppression of macrophage spreading in vitro. **Infection and Immunity**, v. 42, n. 1, p. 421–423, out. 1983.

GANESH, G. V.; RAMKUMAR, K. M. Macrophage mediation in normal and diabetic wound healing responses. **Inflammation Research**, v. 69, n. 4, p. 347–363, 1 abr. 2020.

GIERLIKOWSKA, B. et al. Phagocytosis, Degranulation and Extracellular Traps Release by Neutrophils—The Current Knowledge, Pharmacological Modulation and Future Prospects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 2021.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, mar. 2010.

HARUN, N. H.; SEPTAMA, A. W.; JANTAN, I. Immunomodulatory effects of selected Malaysian plants on the CD18/11a expression and phagocytosis activities of leukocytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 1, p. 48–53, 1 jan. 2015.

ISO. 10993–5: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva, 2009.

JUANG, Y.P.; LIANG, P.H. Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. **Molecules**, v.27, s.25, n.21, p.4974, 2020. doi: 10.3390/molecules25214974.

JOFFE, A. M.; BAKALAR, M. H.; FLETCHER, D. A. Macrophage phagocytosis assay with reconstituted target particles. **Nature Protocols**, v. 15, n. 7, p. 2230–2246, jul. 2020.

KADUŠEVIČIUS, E. Novel Applications of NSAIDs: Insight and Future Perspectives in Cardiovascular, Neurodegenerative, Diabetes and Cancer Disease Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6637, jan. 2021.

KIENZL, M.; KARGL, J.; SCHICHO, R. The Immune Endocannabinoid System of the Tumor Microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 8929, jan. 2020.

KOBIELAK, A.; BODDUPALLY, K. Junctions and Inflammation in the Skin. **Cell Communication & Adhesion**, v. 21, n. 3, p. 141–147, 1 jun. 2014.

KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, p. e23, 11 jul. 2011.

LI, Z.; BRATLIE, K. M. Macrophage Phenotypic Changes on FN-Coated Physical Gradient Hydrogels. **ACS Applied Bio Materials**, 25 ago. 2021.

LIMA, D. R. F. DE et al. Avaliação das propriedades e potencialidades da própolis verde e sua fonte botânica Baccharis dracunculifolia. **Revista Tecnologia e Tendências**, v. 10, n. 2, p. 93–110, 20 dez. 2019.

LÔBO, I. C. P. D. **Eficiência *in vitro* e *in vivo* de extratos de duas plantas forrageiras (*Gliricidia sepium*, *acacia mearnsii*) sobre nematoides gastrintestinas de caprinos.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brasil.

MACHADO, J.L; ASSUNÇÃO, A.K.; DA SILVA, M.C.; DOS REIS, A.S.; COSTA, G.C.; ARRUDA, D.D.E. S.; ROCHA, B.A.; VAZ, M.M.; PAES, A.M.; GUERRA, R. N.; BERRETTA, A.A.; DO NASCIMENTO, F.R. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v.2012, p.157652, 2012. doi: 10.1155/2012/157652

MARCÉN, B.; SOSTRES, C.; LANAS, A. [NSAID and gastrointestinal risk]. **Atencion Primaria**, v. 48, n. 2, p. 73–76, fev. 2016.

MOSKWA J, NALIWAJKO SK, MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA R, GROMKOWSKA-KĘPKA KJ, NOWAKOWSKI P, STRAWA JW, BORAWSKA MH, TOMCZYK M, SOCHA K. Chemical composition of Polish propolis and its antiproliferative effect in combination with *Bacopa monnieri* on glioblastoma cell lines. **Sci Rep.**, n.3, v.10, s.1, pp.21127, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-78014-w.

MELO, A. A. M. DE; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. DE. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 540–548, 1 mar. 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

NOGUEIRA, Naira de Souza Gomes. Avaliação do efeito do extrato aquoso de própolis sobre a viabilidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 irradiadas com Cobalto-60. 2017. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos) - Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, 2017.

NUNES, C. F. et al. Padronização de uma Amostra de Extrato Etanólico de Própolis Verde. **Revista Fitos**, v. 7, n. 01, p. 67–72, 31 mar. 2012.

OLIVEIRA, K.A.M. et al. Atividade Antimicrobiana e Quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. Londrina/PR, v. 33, n. 2, p.211-222, 2012.

OLIVEIRA, J., MOMESSO, L. S. Chemical profile evaluation of comercial samples of propolis from *Apis mellifera* (brown propolis) and from *Baccharis dracunculifolia* (green propolis). Congresso de Iniciação Científica da UNIFIO, Ourinhos, São Paulo, Brasil, 2019.

OGAZON, A. T. et al. Prostaglandin E2 Enhances Gap Junctional Intercellular Communication in Clonal Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5813, 28 maio 2021.

OGBOLE, O. O.; SEGUN, P. A.; ADENIJI, A. J. In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 494, 22 nov. 2017.

PAIXÃO, D. R. DA et al. Efeitos da própolis na proliferação de fibroblastos em lesões cutâneas de ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, 1 jul. 2014.

PEREIRA FAN, BARBOZA JR, VASCONCELOS CC, LOPES AJO, RIBEIRO MNS. Use of Stingless Bee Propolis and Geopropolis against Cancer-A Literature Review of Preclinical Studies. **Pharmaceuticals (Basel)**, n.14, v.14, s.11, pp.1161, 2021. doi: 10.3390/ph14111161.

PERŠURIC, Ž. et al. Assessment of the Biological Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peels. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5916, jan. 2020.

PETER, C. M. et al. Chemical and cytotoxic analyses of three varieties of Brazilian propolis (green propolis, *jataí* propolis and brown propolis) and its anti-*Sporothrix brasiliensis* in vitro activity. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 819–827, 14 jun. 2019.

RAMESH, K. V.; PADMAVATHI, K. Assessment of Immunomodulatory Activity of *Euphorbia hirta* L. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, n. 5, p. 621–625, set. 2010.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Europeennes**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.

ROSS, E. A.; DEVITT, A.; JOHNSON, J. R. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 708186, 2021.

SHIAU, I. L. et al. Quantification for saponin from a soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn) in cleaning products by a chromatographic and two colorimetric assays. **Journal of the Faculty of Agriculture - Kyushu University (Japan)**, 2009.

SILVA-SILVA, J. V. **Estudos Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividade Antileishmania de Espécies Geissospermum (Apocynaceae)**. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

SNYDER, R. J. et al. Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 4, p. 613–629, 2016.

TOBALDINI-VALERIO, F. K. et al. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. **Future Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 1035–1046, ago. 2016.

TSUBOY, M. S. et al. In vitro evaluation of the genotoxic activity and apoptosis induction of the extracts of roots and leaves from the medicinal plant *Coccoloba mollis* (Polygonaceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 3, p. 503–508, jun. 2010.

WOŹNIAK, M. et al. The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, p. 301–308, 26 ago. 2019.