

# Avaliação da citotoxicidade da própolis em tecido subcutâneo de ratos

## Evaluation of propolis citotoxicity in subcutaneous tissue of rats

ARAÚJO, Taciana Ferreira \*  
ARAÚJO, Daniela Ferreira \*\*  
LIMA, Fernanda Penna \*\*  
OLIVEIRA, Laudimar Alves\*\*\*

### RESUMO

O uso de anti-sépticos tem despertado grande interesse na odontologia. Em adição aos procedimentos clínicos, a terapêutica medicamentosa fornece bons resultados à solução de diversas patologias. A própolis, em decorrência de suas diversas propriedades, vem ganhando muito espaço nos estudos em odontologia. O presente trabalho avaliou as reações do tecido subcutâneo de ratos à própolis nas concentrações de própolis a 0,5%; 4% e 8%. Para tanto utilizou-se como recipiente tubos de polietileno para inserção no tecido conjuntivo. Os resultados apontaram para biocompatibilidade da própolis nessas concentrações.

### UNITERMOS

Biocompatibilidade; Própolis; Tecido conjuntivo subcutâneo

### INTRODUÇÃO

A própolis tem sido utilizada pelo homem há milênios. Conhecida pelos Incas, no século XII, já compunha inúmeros medicamentos. A própolis é uma substância de composição complexa, formada por material resinoso, gomoso ou balsâmico, coletado pelas abelhas, de brotos de árvores ou de outras partes do tecido vegetal, modificada na colmeia pela adição de secreções salivares e cera (FRANCO & KUREBAYASHI<sup>4</sup>, 1996).

A própolis vem sendo usada nas apresentações tópica e interna (via gastrointestinal). Entretanto, há a necessidade de comprovação de sua biocompatibilidade em contato íntimo com os tecidos mesenquimais, pois este tipo de aplicação clínica pode resultar em um aumento da toxicidade do material. Além disso, é importante a verificação dos efeitos gerados pela própolis em diferentes concentrações. Qualquer material previamente aceito que sofra uma mudança de pelo menos 5% na sua concentração,

deve ser objeto de testes biológicos. (STANFORD et al.<sup>11</sup>, 1978)

O objetivo deste estudo consiste em avaliar a compatibilidade tecidual da própolis a 0,5%; 4% e 8%, analisando os efeitos desse material implantado em subcutâneo de ratos.

### REVISÃO DE LITERATURA

Na União Soviética, a própolis tem sido usada no combate microbiano, além do múltiplo uso na clínica geral. Sua ação sobre *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *E. coli* e *Salmonella Typhi* foi comprovada. Também foi usada na medicina popular para tratamento de feridas, queimaduras, inflamações agudas, tumores e tuberculose. Na literatura atual, destacam-se propriedades farmacológicas, tais como, antibacteriana, antifúngica, anestésica, anti-inflamatória, hipotensiva, imuno estimulatória e propriedades citostáticas. (LEDON et al.<sup>6</sup>, 1997)

O uso sistêmico do extrato etanólico de própolis em ratos mostrou ação anti-

\* Acadêmica do curso de Odontologia da UnB  
\*\* Estagiárias de Pós-Graduação em Microbiologia Oral da UnB  
\*\*\* Mestre e Doutorando em Ciências da Saúde - UnB

hiperalgésica, não parecendo estar relacionada com o sistema de ativação dos opióides. (CAMPOS et al.<sup>2</sup>, 1998).

Por essas propriedades vários estudos avaliam sua ação na cavidade bucal como no tratamento de gengivites crônicas, moderadas e graves, de difícil controle e estomatites, de diferentes origens, onde relatos de casos clínicos apoiaram a efetividade encontrada com a utilização da própolis. (MAGRO-FILHO<sup>8</sup>, 1998).

Em relação a sua atividade antimicrobiana fungos, produtores de toxinas, e *Streptococcus pyogenes* foram inibidos pela própolis. Um extrato alcóolico de própolis com seis antibióticos convencionais (penicilina, eritromicina, tetraciclina, estreptomina, ampicilina e cloranfenicol) em cepas de *Staphylococcus aureus* e concluíram que 95% das cepas foram sensíveis frente a discos que continham 9 mg de própolis.

LOTUFO<sup>7</sup>, 1998, obteve dados significativos quanto a redução do número, frequência e tempo de duração de úlceras aftosas recorrentes após aplicação de própolis três vezes ao dia. MAGRO-FILHO<sup>8</sup>, 1988, analisando fenômenos cicatriciais sob os efeitos do tratamento com extrato hidro-alcóolico de própolis, observou os efeitos da aplicação da própolis em feridas cutâneas e em alvéolos dentais de ratos albinos. Concluiu que a epitelização ocorreu de forma mais acelerada nas feridas cutâneas e que não houve aceleração da cronologia da reparação das feridas de extração dental.

O extrato de própolis foi testado em ratos sobre exposições diretas da polpa. Assim como o hidróxido de cálcio, a própolis proporcionou uma reorganização normal da polpa e não aumentou a vascularização; foi eficaz mantendo baixa inflamação e pequena população celular microbiana, além de estimular a formação de dentina reparadora. (BRETZ et al.<sup>1</sup>, 1998).

O uso da própolis como agente antimicrobiano na forma de bochechos para inibição do biofilme supragengival foi evidenciado pela sua substantividade, segurança e possibilidade de uso clínico.

A avaliação da biocompatibilidade dos materiais envolve não apenas os aspectos físicos e biológicos do material, como também os dos tecidos naturais que

estão sendo colocados. Os testes *in vitro* para os novos materiais têm o objetivo de evitar ou diminuir o tempo e o custo de tentativas clínicas. Por sua eficiência, podem também eliminar a ocorrência de efeitos indesejáveis locais ou sistêmicos no organismo, que podem surgir a longo prazo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Fase cirúrgica

Doze ratos (*Rattus norvegicus*, var. *Albinus rodentia mammalia*, machos, adultos) foram submetidos à seguinte seqüência operatória: a) anestesia geral com

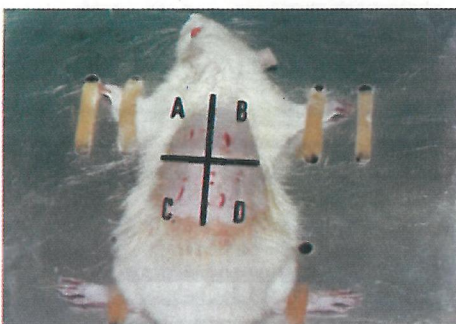


FIGURA 01 – Imagem evidenciando as incisões na região dorsal do rato, após tricotomia, para inoculação da substância teste. Adaptado de DEPIERI<sup>9</sup> (1999)



FIGURA 02 – Imagem evidenciando a inoculação dos tubos de polietileno com a substância teste. Adaptado de DEPIERI<sup>9</sup> (1999)

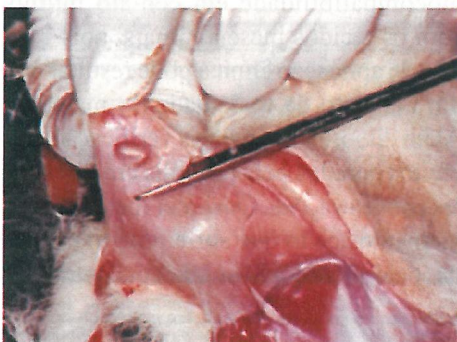


FIGURA 03 – Imagem evidenciando a remoção do tubo de polietileno com a substância teste. Adaptado de DEPIERI<sup>9</sup> (1999)

b) tionembutal, intraperitoneal; b) tricotomia e anti-sepsia do campo operatório com álcool iodado a 2%; c) 4 incisões paralelas à linha média; formando lojas cirúrgicas, uma em cada quadrante do dorso, onde foram inoculadas as amostras com auxílio de um porta amálgama de acordo com a distribuição abaixo (Figuras 1 e 2): 1 - Grupo A: controle – esponja de gelatina absorvível (Gelfoam<sup>R</sup>); 2 - Grupo B: Gelfoam + solução de própolis a 0,5%; 3 - Grupo C: Gelfoam + solução de própolis a 4%; - 4 Grupo D: Gelfoam + solução de própolis a 8%; d) sutura da derme com fio mononylon 3.0;

e) sacrifício: overdose com tionembutal no 7º, 15º e 45º dia, perfazendo 3 grupos de 4 animais; f) as amostras foram removidas (Figura 3). e após exame macroscópico, fixadas em solução de formol a 10% tamponado.

### Fase laboratorial

● As lâminas foram coradas com HE, e observadas em aumentos de 100 e 400X.

Padrão de observação histológica segundo FDI (Fédération Dentaire Internationale):

● Inflamação incipiente: ausência à mínima reação tecidual. Tecido está bem organizado e não apresenta reação inflamatória na região exposta ao material, no fim do tubo, e ao longo da hemisseção.

● Inflamação moderada: Algumas células inflamatórias são encontradas ao longo do material inoculado, mas há ausência ou mínima quantidade ao longo da secção mediana da “esponja”. O tecido adjacente ao material testado mantém sua estrutura, mas contém alguns leucócitos, linfócitos, células plasmáticas, macrófagos e ocasionais células de corpo estranho.

● Inflamação severa: Tecido fibroso não inflamatório ao longo da secção medial e reação tecidual ao final do tubo. Nesta região, o tecido perde sua estrutura e contém um acúmulo de neutrófilos e linfócitos. Apresenta também células plasmáticas, macrófagos e ocasionais células de corpo estranho (inflamatórias crônicas). A presença contínua de leucócitos

**Tabela 1** – Comparação da resposta inflamatória frente às diferentes concentrações de própolis nos períodos de 7, 15 e 45 dias

	7 dias	15 dias	45 dias
Controle	moderada	incipiente	incipiente
0,50%	moderada	moderada	moderada
4%	moderada para severa	moderada	moderada
8%	moderada para severa	moderada para severa	moderada

neutrófilos indica contínua desintegração tecidual causada pelo material.

● Necrose

A interpretação dos resultados baseou-se nos seguintes critérios:

● Há biocompatibilidade quando há ausência à baixa reação constantes, ou quando há moderada reação que diminui com o tempo.

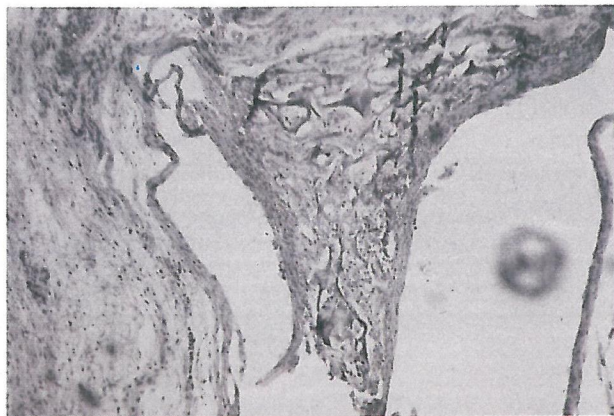
● Há rejeição quando há ausência de reação à princípio, mas esta aumenta para moderada ou severa; quando há moderada ou severa reação constantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento celular e tecidual frente a uma substância consiste num dos primeiros passos para avaliar a compatibilidade de um material com os organismos vivos. Nesse aspecto o presente trabalho avaliou a ação da própolis em três concentrações inoculadas em tecido subcutâneo de ratos.

Os resultados descritos na tabela 1 foram agrupados considerando as características gerais de cada grupo.

Para cada amostra foi observado mais de um corte, e feita comparação com as amostras contendo o mesmo material durante períodos semelhantes. Após essa análise foram apresentados em forma de



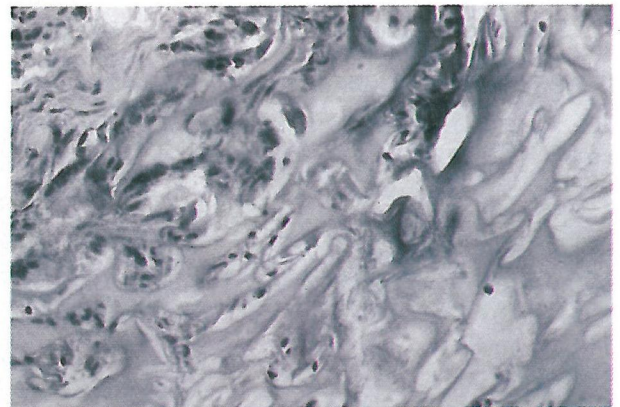
**FIGURA 04** – Invaginação tecidual para dentro do tubo de polietileno

tabela os aspectos mais significativos de cada amostra/período.

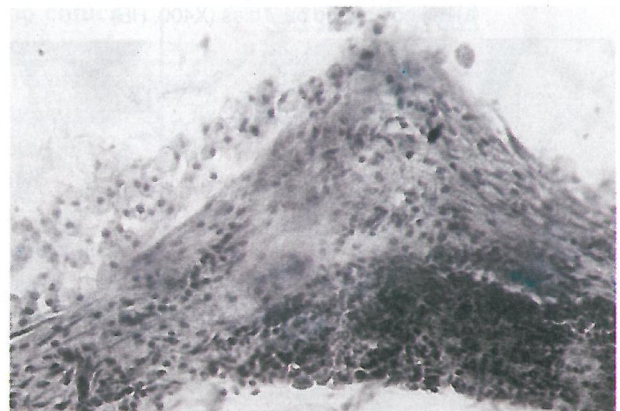
No presente trabalho os resultados apontaram uma crescente resposta inflamatória diretamente proporcional à concentração da própolis, mas todas elas tenderam para um processo de reparo. Observou-se um aumento do número de células inflamatórias nos tecidos em que foram implantados esponja de gelatina reabsorvível associada à própolis nas concentrações de 4% e 8%, em relação à concentração de 0,5%. Em todos os grupos estudados, houve proliferação de tecido, que se invaginou para dentro do tubo como consequência de sua implantação com esponja de gelatina reabsorvível e própolis, indicando uma resposta favorável do tecido, na tentativa de reparo (Figura 4). Dessa forma, observa-se que a própolis, não teve influência deletéria sobre o tecido, permitindo sua reparação e cicatrização. Não foi possível, com os dados analisados, afirmar que o medicamento apresenta propriedades de aceleração do processo de reparo, embora diversos trabalhos de natureza clínica apontem essas características.

Enquanto nas amostras utilizadas como controle – tubo de polietileno em associação à esponja reabsorvível (gelfoam<sup>®</sup>) – o comportamento tecidual mostrou-se homogêneo restringindo-se a uma resposta inflamatória incipiente, evidenciada principalmente no período de 7 e 15 dias, nas amostras que continham própolis esses resultados se mostraram mais intensos.

No grupo controle, observou-se poucas células inflamatórias e a evolução para um processo de reparo caracterizado pela grande presença de fibras colágenas e fibroblastos, no período de 45 dias (Figuras 5 e 6). A presença de reação inflamatória incipiente é atribuída à injúria ao tecido conjuntivo, provocado pela incisão, divulsão e inserção da gelatina durante a fase cirúrgica do experimento. No grupo B, própolis 0,5%, observou-se aos 7 dias, resposta inflamatória em estágio intermediário entre moderada e severa, estando o tecido desorganizado e com áreas de necrose em contato com o material ino-



**FIGURA 05** – Imagem evidenciando reação inflamatória entremendo a esponja de gelatina reabsorvível em grupo controle, no período de 7 dias (X 400, HE)



**FIGURA 06** – Resposta tissular evidenciada em grupo controle aos 45 dias (X 400, HE)



FIGURA 07 – Reação inflamatória em tecido com própolis a 0,5% no período de 7 dias (X400, HE)

culado (Figura 7). Após 15 dias, o tecido ainda estava relativamente desorganizado e com vasos hiperemiados e hemácias extravasadas. Já aos 45 dias, observou-se fibras colágenas e fibroblastos em organização, diminuição de células inflamatórias e fagocitose de hemácias extravasadas por macrófagos, evidências de que a reação inflamatória local estava sendo resolvida (Figura 8). Portanto, houve uma boa aceitação biológica para essa concentração de própolis pelo tecido.

No grupo C, própolis a 4%, observa-

se reação inflamatória em estágio intermediário entre moderada e severa aos 7 dias, com a presença de infiltrado inflamatório entremeando o Gelfoam com maior quantidade de células em relação ao grupo B (Figura 9). Com 15 dias, houve início de organização da camada de fibras colágenas e fibroblastos. Com 45 dias, observou-se uma tendência ao reparo e ausência de restos de gelatina absorvível, indicando sua biodegradação (Figura 10).

Grupo D, 8% de solução de própolis, apresentou reação inflamatória um pou-

co mais intensa em relação aos grupos B e D e pequena invaginação tecidual para dentro do tubo. Com 7 dias, observou-se áreas de necrose em contato com o material, edema e células mononucleares, sendo evidenciado um processo inflamatório classificado como moderado para severo (Figura 11). Após o período de 15 dias, distinguiu-se uma reação de inflamação moderada. Com 45 dias, observou-se, ainda, algumas células mononucleares, mas uma tendência ao reparo (Figura 12).

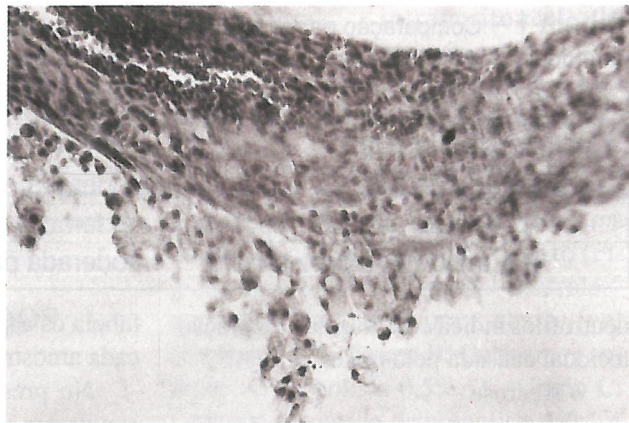


FIGURA 08 – Reação tecidual evidenciando a inoculação de própolis a 0,5% no período de 45 dias (X 400, HE)



FIGURA 09 – Característica tecidual da inoculação da própolis a 4%, no período de 7 dias (X400, HE)

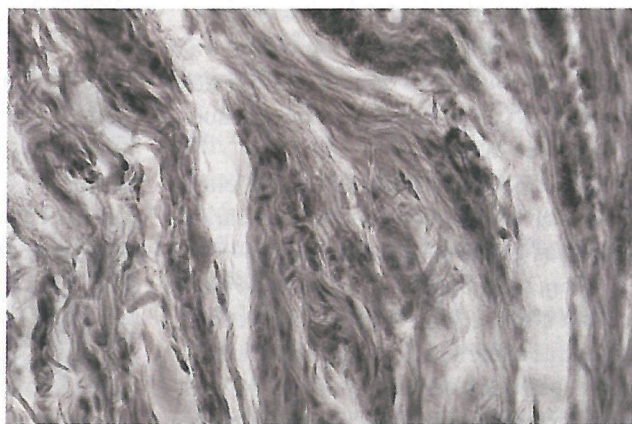


FIGURA 10 – Tecido em reparação evidenciando inoculação de própolis a 4% no período de 45 dias (X400, HE)

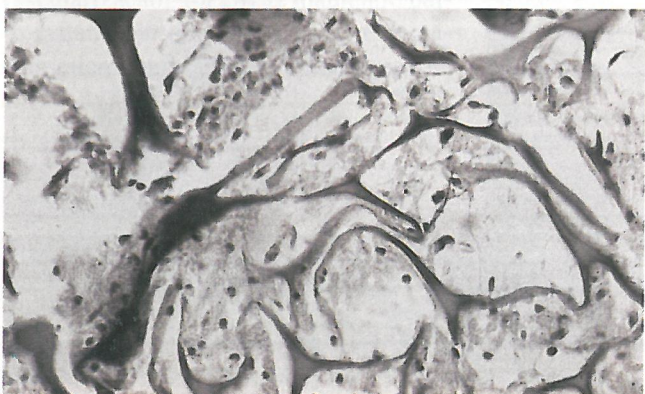


FIGURA 11 – Imagem evidenciando inoculação de própolis a 8% após 7 dias (X400, HE)

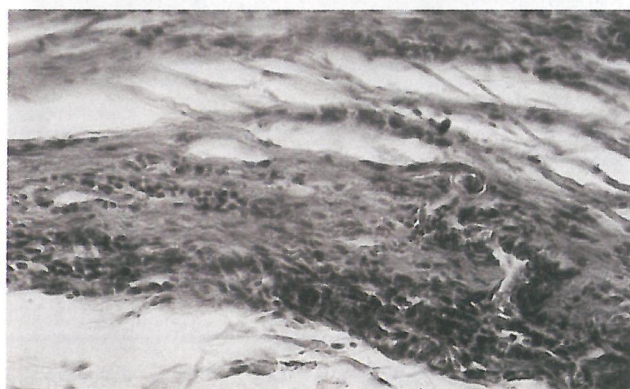


FIGURA 12 – Característica tecidual da inoculação de própolis a 8% no período de 45 dias (X400, HE)

Adotando critérios de gradação da resposta inflamatória o presente trabalho estabelece parâmetros objetivos para análise do grau de lesão tecidual. Corroborando outros trabalhos verificou-se um comportamento aceitável quanto à resposta tecidual. Isso sugere novos estudos em relação a ação da própolis em tecidos vivos e a observação do estímulo desse material à regeneração tecidual.

## CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos é procedente concluir que:

1. Os resultados apontaram uma crescente resposta inflamatória diretamente proporcional à concentração da própolis, mas todas elas tenderam para um processo de reparo;
2. A própolis demonstrou-se biocompatível, pois proporcionou reações inflamatórias incipientes e/ou moderadas que diminuíram com o tempo, e possibilitou invaginação tecidual para dentro do tubo
3. Não foi evidenciada aceleração no processo de reparo nas amostras com uso de própolis.

## ABSTRACT

Man had used the propolis for many years. This complex substance has interesting properties in dentistry. It has been used as antibiotic, anti-inflammatory and analgesic. Its topical and internal utilization have been told in literature. However, this is necessary to prove its biocompatibility when in contact with connective tissues. This is important because the clinical use can result in increase of toxicity of the material. Any material that changes at least 5 % in its concentration must be tested. Biocompatibility tests of propolis 0,5%, 4% and 8% were made in this study. The effects of its implantation in connective tissues of rats were analyzed. The results show that is biocompatible in these concentration

## UNITERMS

**Propolis, biocompatibility, connective tissue.**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRETZ, W. A.; CHIEGO-JÚNIOR, D.J.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.; CUSTODIO, A.; SCHNEIDER, L.G. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. *Z Naturforsch (C)*; 53 (11-12): 1045-8, 1998 Nov-Dec.
2. CAMPOS, R.O.; PAULINO, N.; SILVA, C.H.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J.B. Anti-hiperalgesic effect of na ethanolic extract of propolis in mice and rats. *J Pharm Pharmacol*; 50 (10): 1187-93, 1998 Oct.
3. DEPIERI, A. A. Biocompatibilidade dos cimentos endodônticos Endion, Sealer 26 e Fillcanal: Avaliação em tecido subcutâneo de rato. Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 1999.
4. FRANCO, T. T. & KUREBAYASHI, A. K. Isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e dosamento espectrofotométrico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2): 81-86, 1996.
5. KUJUMGIEV, A.; et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol*; 64(3):235-40,1999. url/http://www.bireme.br/cgi-bin/IAH2/. Recuperado em 11 fev. 2000.
6. LEDON, N.; CASACO, A.; GONZALEZ, R.; MERINO, N.; GONZALEZ, A.; TOLON Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of na extract of red propolis. *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao*; 18(3): 274-6,1997 May.
7. LOTUFO, M. A. Avaliação clínica do uso tópico de própolis em pacientes com úlceras aftosas recorrentes do tipo minor. Disponível na url /http://www.bireme.br/cgi-bin/IAH2<sup>3</sup>. Recuperado em 8 fev. 2000.
8. MAGRO-FILHO, O. Reparação de alvéolo dental e de ferida cutânea após irrigação com solução de própolis: estudo histológico em ratos. Araçatuba; s.n.; 1998. 83p.ilus, tab. Tese.
9. MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. F. **Inflamação**. Programa nacio-

nal de atualização médica Fontura Wyeth, 1978.

10. ROBBINS, M. D.; et al. Patologia Básica. Atheneu editora, São Paulo, 1986. SMITH, D. C. A. Biological properties of dental materials. *Dent. Pract.*, 20:81, 1969.
11. STANFORD, J. W.; et al. Recommended standard practies for biological evaluation of dental materials. Volume 30, No 2, 1978.



**Cirurgião-Dentista**  
**Endodontia**  
CRO-3923

**FONE: (62) 223-6613 / 223-4079**

Rua 59-A nº 978 - Setor Aeroporto  
e-mail: clauberth.oliveira@zaz.com.br