

Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis

Reis, C.M.F.¹; Carvalho, J.C.T.^{1*}; Caputo, L.R.G.²; Patrício, K.C.M.²;

Barbosa, M.V.J.²; Chieff, A.L.³; Bastos, J. K. ⁴

¹Laboratório de Fitofármacos, Instituto de Farmácia e Nutrição, Universidade de Alfenas;

²Laboratório de Patologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Alfenas;

³Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp/Araraquara;

⁴Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP/Ribeirão Preto.

RESUMO: Avaliou-se a atividade antiinflamatória do extrato etanólico de própolis – EEP, sobre o edema desencadeado por carragenina, dextrana e histamina. O EEP apresentou dose eficaz (DE_{50}) de 650 mg/kg (v.o), inibindo significativamente o processo inflamatório desencadeado pela carragenina, mas não inibiu o produzido por dextrana. O EEP antagonizou ainda o efeito edematogênico produzido por histamina. Nas úlceras produzidas por estresse, o EEP inibiu de forma significativa a geração dos diversos tipos classificados. Em todos os parâmetros analisados no estudo da toxicidade em fase de tratamento subcrônico (hematológicos, bioquímicos e histopatológicos), o grupo tratado com o EEP não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Desta forma, sugere-se que na dose de 650 mg/kg (dose eficaz) não existe a presença de efeitos tóxicos que possam comprometer a utilização deste extrato.

Unitermos: extrato etanólico de própolis, antiinflamatório, antiúlcera gástrica, toxicidade.

ABSTRACT: The antiinflammatory activity of Ethanolic Extract of Propolis – EEP was evaluated on edema induced by carrageenan, dextran and hystamine. The inflammatory process induced by carrageenan was significantly reduced by the treatment with EEP (650 mg/kg, p.o), while it did not interfere in the response induced by dextran. The EEP antagonized the edematous effect produced by hystamine. The EEP promoted a significant inhibition in the generation of the ulcers induced by stress ($p < 0.05$). The hematological, biochemical and histopathological parameters presented no differences between treated and control groups. Therefore it can be concluded that the effective dose of 650 mg/kg of the EEP has no toxic effect which may compromise the use of this extract.

Key words: ethanolic, extract of propolis, anti-inflammatory, gastric anti-ulcer, toxicity.

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto de composição complexa constituída de material gomoso, resinoso e balsâmico. As abelhas usam a própolis para recobrir a parede da colméia, reforçar os favos, preencher as fissuras, restringir a entrada, e embalsamar animais. Esta última operação impede o processo de putrefação, devido à atividade antimicrobiana da própolis (Gallo e Savi, 1995)

Análises laboratoriais revelam que a própolis é composta de 55% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen. Estes dados podem variar de acordo com a região geográfica e flora existente. Nas resinas encontram-se vários componentes que já foram isolados e suas estruturas químicas determinadas. Os principais componentes da própolis são flavonóides, especialmente flavonas, flavonóis e flavanonas. Foram identificados também ácidos

α -acetoxibetulênico, caféico e ferúlico, e aldeídos aromáticos (Putkammer, 1987), entre outros.

A própolis tem grande aplicação terapêutica e industrial. Suas principais propriedades são: antibiótica, cicatrizante, antiviral, antiinflamatória, antioxidante, bactericida, analgésica e anestésica (Putkammer, 1987), entre outras.

Baseado em todos estes aspectos, este trabalho teve como objetivos avaliar a atividade antiinflamatória do extrato etanólico de própolis (EEP), determinando sua dose eficaz a 50%, sua possível ação antiúlcera gástrica, e sua toxicidade com tratamento subcrônico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da matéria-prima (própolis)

A matéria-prima foi obtida na região de Oliveira e Bambuí no Estado de Minas Gerais, no mês de abril de 1997. As espécies vegetais mais utilizadas pelas abelhas nesta região, envolvidas na produção da própolis, são as seguintes: *Lantana microphylla* Cham. (Verbenaceae), *Heterothalamus brumoides* Less. (Asteraceae), *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae), *Vernonia brevifolia* Less. (Asteraceae), *Boehmeria candata* Sw. (Urticaceae), *Vernonia grandiflora* Less. (Asteraceae), e *Vernonia ruficoma* Schlech. (Asteraceae).

Obtenção do extrato da própolis e preparo das amostras.

A própolis bruta foi, após congelamento, triturada até pó fino, em seguida submetida a maceração por 72 horas na presença de solução hidroalcoólica a 70%, e percolada por três vezes com fluxo de 50 ml/min. A concentração final foi de 10% de sólidos solúveis no extrato etanólico obtido (resíduo seco). Amostras do extrato etanólico de própolis (EPP) foram colocadas em placas de petri e deixadas à temperatura ambiente para evaporação do conteúdo etanólico. Após a evaporação, o resíduo restante foi empregado nos diversos ensaios. As soluções do EEP para o tratamento dos animais foram obtidas solubilizando-se o resíduo da evaporação em solução de Tween a 5%.

Perfil cromatográfico do extrato etanólico de própolis (EEP)

Para a análise do EEP por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizaram-se as seguintes condições cromatográficas: sistema de eluição gradiente multi-linear com fase móvel de solução de ácido acético 0,8% em água; 5% de metanol; 0,3% de acetato de amônio (bomba A) e acetonitrila (bomba B), começando com o gradiente contendo 75% do sistema da bomba A/ 25% da bomba B e terminando com 100% de acetonitrila, com tempo total de análise de 60 min. O fluxo foi de 1ml/min e a detecção de varredura entre 250-350 nm. O tempo de reequilíbrio da coluna de fase reversa C-18, utilizando-se a fase móvel inicial, foi de 15 min.

Para a análise de triterpenos, inicialmente o EEP foi resuspenso em solução hidrometanólica 5% e deixado em baixa temperatura (4 °C) por 24 h. para precipitação das ceras. Em seguida, foi filtrado e submetido à partição líquido-líquido com hexano. A fração hexânica foi concentrada em evaporador rotatório e analisada por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar frente a padrões de esteróides e triterpenos de origem vegetal. Para as análises foi utilizada coluna capilar de sílica fundida HP-50 (50% fenilmetilsilicone), 30m x 0,25mm (diâmetro interno), e hidrogênio na vazão de 1,5 ml/min como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas a 260 °C e 290 °C, respectivamente. O programa de temperatura do forno iniciou com 270 °C, mantidos por 5 min, seguidos de incremento de 1,5 °C/min até atingir 285 °C. A injeção foi manual, feita no modo "split" 40:1 e para detecção utilizou-se detector por ionização de chamas.

Avaliação das atividades antiinflamatória e antiúlcera gástrica, e da toxicidade subcrônica do EEP

Animals

Foram utilizados ratos Wistar (machos) com peso em torno de 140 – 180 g e camundongos Swiss albinos (machos) com peso em torno de 20-25 g. Os mesmos foram mantidos em jejum por 24 h antes dos experimentos, com livre acesso a água.

Via de administração do EEP

O EEP foi administrado inicialmente 30 min antes da injeção do estímulo inflamatório, por via oral, através de gavagem. Para a determinação da DE_{50} , o tratamento foi realizado 30 min depois da aplicação do agente inflamatório.

Determinação da dose eficaz 50 (DE_{50})

A DE_{50} foi determinada baseando-se no edema provocado por carragenina. Para tanto, grupos de ratos foram tratados por via oral com doses crescentes do EEP (200, 400 e 800 mg/kg) 30 min depois da aplicação do estímulo inflamatório. A DE_{50} foi determinada a partir da análise dos probitos, referente às doses e suas respectivas percentagens de inibição.

Medida do edema

Como agente flogístico, foi utilizada carragenina (1000 mg/pata, Iota-Fluka Biochemika), dextrana (100 mg/pata, T-70, MW 70.000, Pharmacia) ou histamina (50 mg/pata, dihidroclorato, Sigma) no volume de 0,1 ml. Estes agentes inflamatórios foram aplicados na região plantar de uma das patas posteriores dos ratos, sendo a outra pata, controle, na qual foi injetado idêntico volume de solução salina. A medida do edema foi baseada na técnica descrita por Carvalho (1998), a qual consiste na utilização do pletismômetro da Hugo Basile (Mod. 7140). Assim, a pata do rato foi imersa até a região tíbio-társica em uma cuba contendo solução de lauril-sulfato de sódio a 0,2%, e o registro foi realizado no sistema computadorizado. A diferença entre a pata edemaciada e a que recebeu somente solução salina forneceu o volume do edema em ml. No edema causado por dextrana e histamina foi utilizado como controle positivo cloridrato de ciproepitadina (10 mg/kg, v.o, Sigma).

Avaliação da atividade antiúlcera gástrica do EEP

As úlceras foram induzidas segundo método de Rainsford e Whitehouse (1977). Os animais ficaram em jejum com livre acesso a água por um período de 24 horas e, após este procedimento, foram tratados oralmente com água (controle), EEP (teste, 650 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg, Sigma). Imediatamente os animais foram transferidos para um banho com água corrente (25 °C) permanecendo individualmente em um tubo contensor, por um período de 17 horas. Depois deste tempo, cada animal foi morto e o estômago foi removido e aberto pela grande curvatura. As lesões foram examinadas através de lupa estereomicroscópica binocular com amplitude de 10 x. O número e severidade das lesões induzidas pelo estresse foram contadas, e avaliadas em tipos: Tipo I: presença de edema, hiperemia e hemorragia puntiformes (petéquias); Tipo II: presença de lesões hemorrágicas com pequenas erosões na submucosa; e Tipo III: presença de erosões severas com bordas hemorrágicas e algumas lesões invasivas. O índice de lesão foi determinado a partir do método descrito por Basile et al. (1990).

Estudo da toxicidade do EEP

Determinação da DL_{50}

Para a determinação da dose letal média, foram utilizados grupos de camundongos (n = 10) pesando 20 a 25 g que receberam, por via oral, doses únicas de diferentes concentrações do EEP. Estes animais foram observados por um período de 72 horas. O número de animais

mortos foram expressos em porcentagem e a DL_{50} estabelecida pelo método dos probitos.

Estudo da toxicidade subcrônica do EEP

Para esta avaliação foram utilizados dois grupos de ratos com peso inicial em torno de 140 g, os quais foram mantidos em gaiolas metabólicas, e seus pesos controlados a cada 5 dias no período de 30 dias. Diariamente um dos grupos ($n = 10$) recebeu por via oral (gavage) dose única (650 mg/kg - 0,5 ml) do EEP, e o outro grupo (controle, $n = 10$) foi tratado com solução de Tween 5% (solução utilizada para veiculação do EEP).

Após os 30 dias, os animais foram sacrificados e submetidos à necropsia completa e o sangue à análise hematológica e bioquímica. Na necropsia foi dada ênfase, com análise mais detalhada, aos fígados e rins. Toda alteração macroscópica encontrada foi analisada por microscopia de luz. De cada animal foi retirado todo o tubo digestivo desde o esôfago até o ânus. O estômago foi aberto pela grande curvatura, e o intestino, na implantação do mesentério. O tubo digestivo foi colocado em solução fixadora (Formol 10% tamponado), distendido e preso, com auxílio de alfinetes, sobre placas de cortiça de 3 mm de espessura, tomando-se o cuidado para a serosa permanecer em contato íntimo com a mesma. Os conjuntos tubo digestivo e cortiça foram colocados em solução fixadora de tal maneira que a mucosa ficasse imersa na solução. Com auxílio de lupa, examinou-se todas as mucosas e na suspeita de qualquer tipo de lesão, a região afetada foi incluída em parafina e, foram realizados cortes seriados que foram corados com hematoxilina-eosina. O fígado de cada animal foi retirado, pesado, examinado e três ou quatro fragmentos dos diferentes lobos, medindo cerca de 1cm^3 cada, foram imersos em solução fixadora (Formol 10% tamponado) durante 24 a 48 horas. Após este tempo, foram incluídos em parafina e, em série, cortados com auxílio de micrótomo. O restante do material hepático foi armazenado a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ para futuras análises. Os rins foram retirados, examinados e cortados longitudinalmente, fornecendo ampla visão macroscópica das regiões corticais e medulares. Fragmentos destas partes foram imersos em solução fixadora (Formol 10% tamponado) e, posteriormente, incluídos em parafina para cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina. O parâmetro utilizado para o registro das alterações observadas nos dois grupos, por microscopia óptica, foi a porcentagem de ocorrência.

Análise estatística

Para análise estatística dos resultados obtidos nos diversos experimentos foi utilizada análise da variância (ANOVA), e para a determinação do coeficiente de correlação foi utilizada regressão linear. Resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Também foram aplicados os testes "t" de Student e "U" de Mann-Withney para análise comparativa das médias encontradas, com nível de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela cromatografia líquida de alta eficiência, foram identificados o fenilpropanóide ácido p-hidroxicumárico e os flavonóides kaempferídeo, aromadendrina-4'-metil éter e isosakuretina, e pela cromatografia capilar de fase gasosa: sitosterol, α -amirina e β -amirina.

O tratamento com doses crescentes do EEP (200, 400 e 800 mg/kg), por via oral, 30 min após a aplicação do estímulo inflamatório (carragenina), produziu efeito dose-dependente, cujo coeficiente de correlação foi de $r = 0,912$, e o efeito máximo observado foi para a dose de 800 mg/kg. A DE_{50} determinada pelo método dos probitos foi de 650 mg/kg (Tabela 1).

TABELA 1. Efeito da administração oral do Extrato Etanólico de Própolis - EEP - (200, 400, 650 e 800 mg/kg) sobre o edema provocado por carragenina (1000 mg/pata), dextrana (100 mg/pata) ou histamina (50 mg/pata), no pico máximo de edema (120 min após aplicação do estímulo (carragenina), 90 min (dextrana) e 60 min (histamina)).

Grupo	Dose (mg/kg)	Carragenina	Dextrana	Histamina
Controle (sol. Tween 80)	0,5 ml	2520 ± 210	–	–
EEP	200	2275 ± 175*	–	–
EEP	400	1925 ± 175*	–	–
EEP	800	1715 ± 178*	–	–
Controle (sol. Tween 80)	0,5 ml	–	3326 ± 84	–
EEP	650	–	2694 ± 126	–
Ciproeptadina	10	–	1305 ± 85*	–
Controle (sol. Tween 80)	0,5 ml	–	–	1591 ± 57
EEP	650	–	–	1194 ± 171*
Ciproeptadina	10	–	–	853 ± 95*

DE₅₀ = 650 mg/kg. $r = 0,912$.

Os números representam a Média ± EPM (μ) de $n = 5$ /grupo. * $p < 0.05$ (teste "t" de Student).

O edema por carragenina foi escolhido como modelo para o estudo do EEP por tratar-se de modelo bem conhecido aliado ao fato de desencadear um estado inflamatório decorrente da liberação de prostaglandinas, serotonina e outros mediadores (Di Rosa, 1972). Baseado no resultado encontrado, cujo efeito foi do tipo dose resposta, pode-se sugerir que o EEP atua inibindo o processo inflamatório desencadeado por carragenina.

Por outro lado, no edema por dextrana, deve-se considerar que a injeção deste agente inflamatório na pata de rato é um modelo experimental conhecido, e que o edema produzido é consequência da liberação de histamina e serotonina dos mastócitos (Rowley e Benditt, 1956), o que o diferencia do edema induzido pela carragenina. Quando administrado por via oral (650 mg/kg), 30 min antes da injeção de dextrana (100 mg/pata), o EEP não produziu inibição significativa do edema. Entretanto, quando avaliado sobre o edema desencadeado por histamina (50 mg/pata), o EEP antagonizou a resposta inflamatória desenvolvida por este mediador inflamatório de forma significativa, até o final da mensuração. Tanto no edema por dextrana, quanto no edema por histamina, utilizou-se a ciproeptadina como fármaco padrão, substância essa bloqueadora de receptores H1, a qual inibiu significativamente ambos os processos edematogênicos. Fármacos antiinflamatórios não esteroidais, tal como a indometacina, são altamente usados no tratamento de inúmeras condições inflamatórias, mas o aparecimento de lesões gastrintestinais tem limitado sua utilização clínica (Rainsford, 1975; Carson e Stron, 1993).

No experimento de úlcera por estresse, observou-se que o tratamento dos animais com indometacina (10 mg/kg, v.o.) produziu um maior número de lesões, quando comparado aos tratados com o EEP, na dose de 650 mg/kg (v.o.) (Tabela 2).

TABELA 2. Efeito da administração oral do Extrato Etanólico de Própolis - EEP (650 mg/kg), solução de Tween 5% e indometacina sobre a incidência de lesões gástricas agudas, produzidas por estresse (17 h), utilizando restrição de movimentos mais imersão em água.

Tratamento	N	Dose (mg/kg)	Tipos de lesões			Índice de lesão
			I	II	III	
Tween 5% - Controle	5	0,5 ml	57 ± 4	21 ± 1	10 ± 2	26
EEP	5	650	20 ± 4*	9 ± 2*	4 ± 0,8*	9,5*
Indometacina	5	10	25 ± 3	43 ± 4	34 ± 5	27

* $p < 0,05$, teste "t" de Student (em relação ao grupo controle e a indometacina)

Com base nestes resultados, pode-se sugerir que, apesar do EEP atuar sobre o edema por carragenina, cujos mediadores envolvidos são prostaglandinas, ele não provoca danos na mucosa gástrica semelhantes aos antiinflamatórios não esteroidais.

A dose letal encontrada para o EEP, após 24 horas do tratamento (v.o.), foi de 3000 mg/kg, sendo que para doses menores que a DL50, não foram observadas ocorrências de sinais de intoxicação.

Quanto ao consumo de ração e água, desenvolvimento ponderal e diurese não houve diferença significativa entre os grupos (Figuras 1, 2, 3 e 4), e todos os dados mantiveram-se dentro dos parâmetros estabelecidos para esta espécie animal (Christensen, 1974).

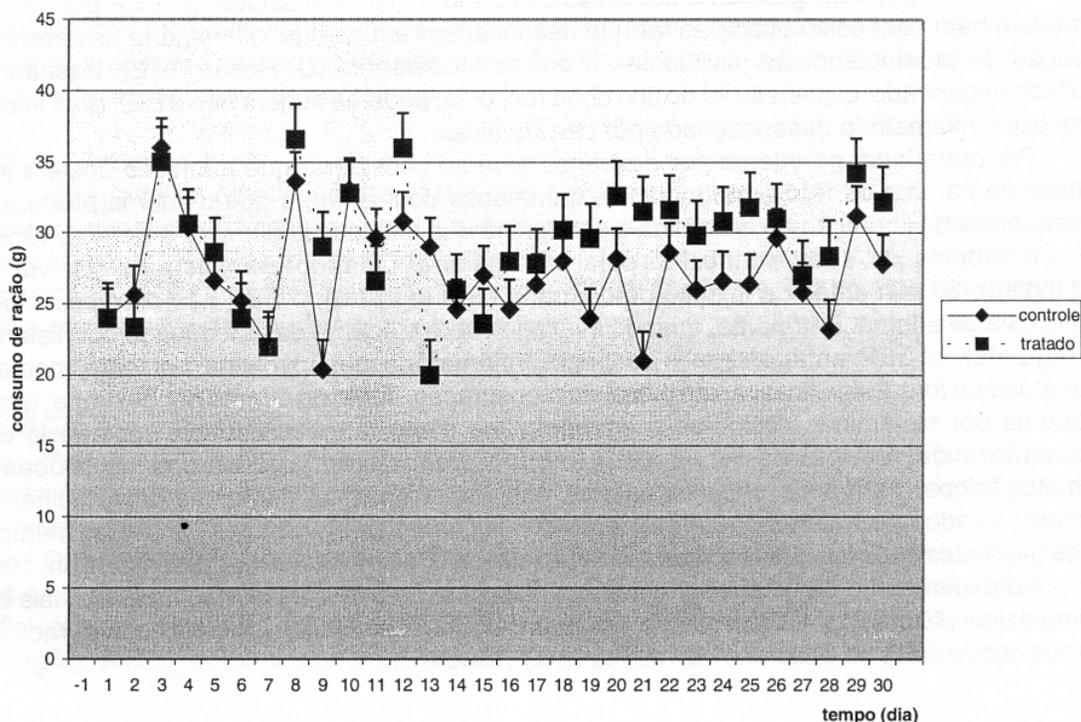


FIGURA 1. Consumo de ração dos animais tratados com o Extrato Etanólico de Própolis - EEI (650 mg/kg, v.o.) e solução de Tween 5% (grupo controle), durante trinta dias. Cada ponto representa o valor da média ± EPM de 10 animais.

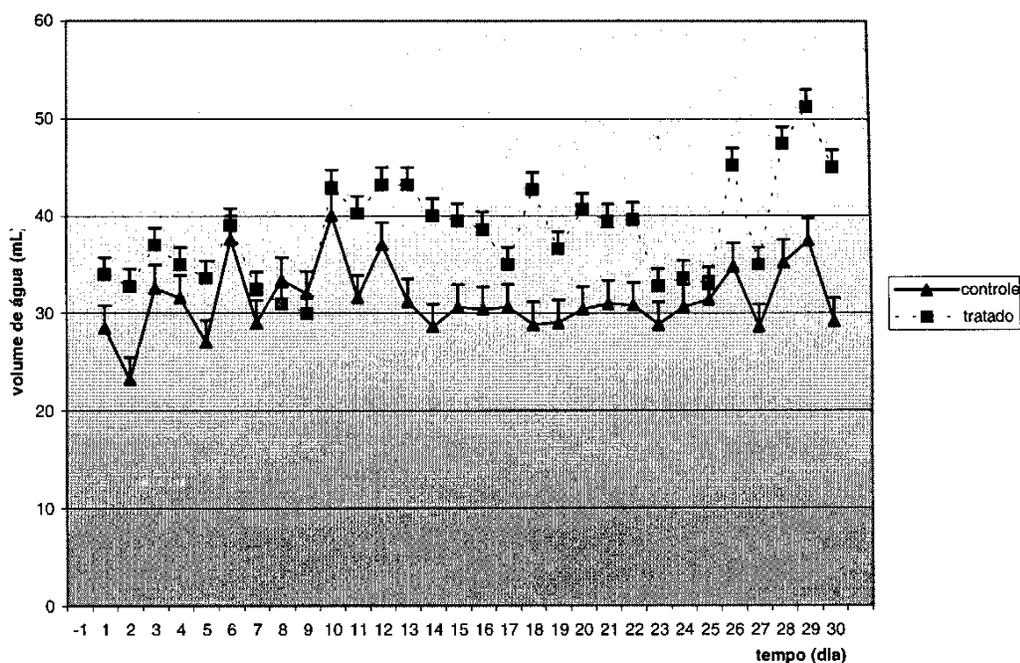


FIGURA 2. Consumo de água dos animais tratados com o Extrato Etanólico de Própolis - EEP (650 mg/kg, v.o.) e solução de Tween 5% (grupo controle), durante trinta dias. Cada ponto representa o valor da média \pm EPM de 10 animais.

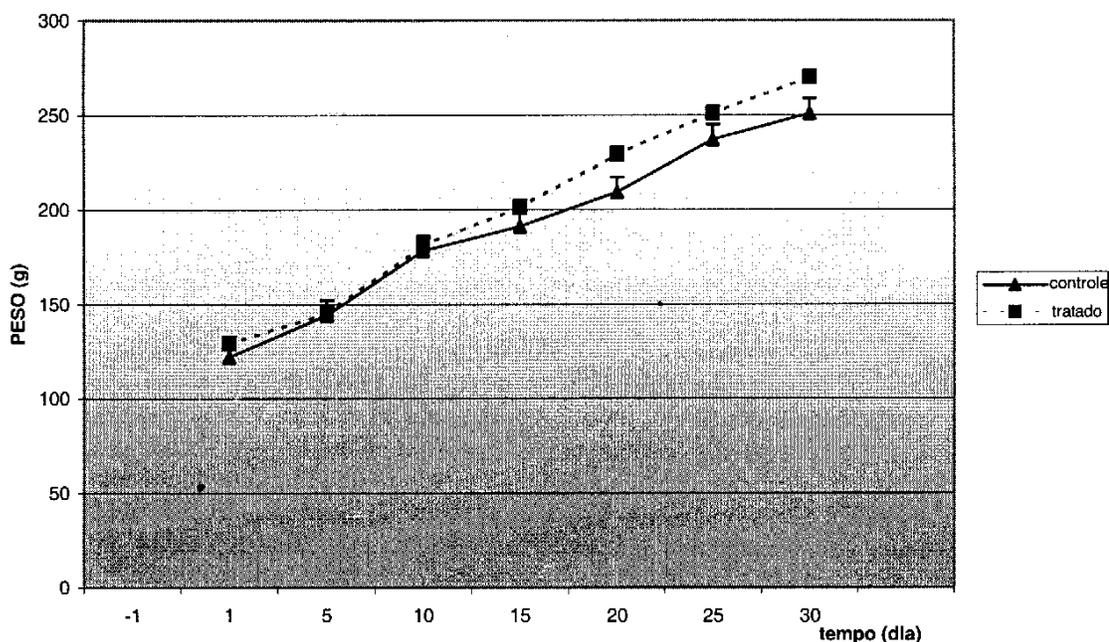


FIGURA 3. Desenvolvimento ponderal dos animais tratados com o Extrato Etanólico de Própolis - EEP (650 mg/kg, v.o.) e solução de Tween 5% (grupo controle), durante trinta dias. Cada ponto representa o valor da média \pm EPM de 10 animais.

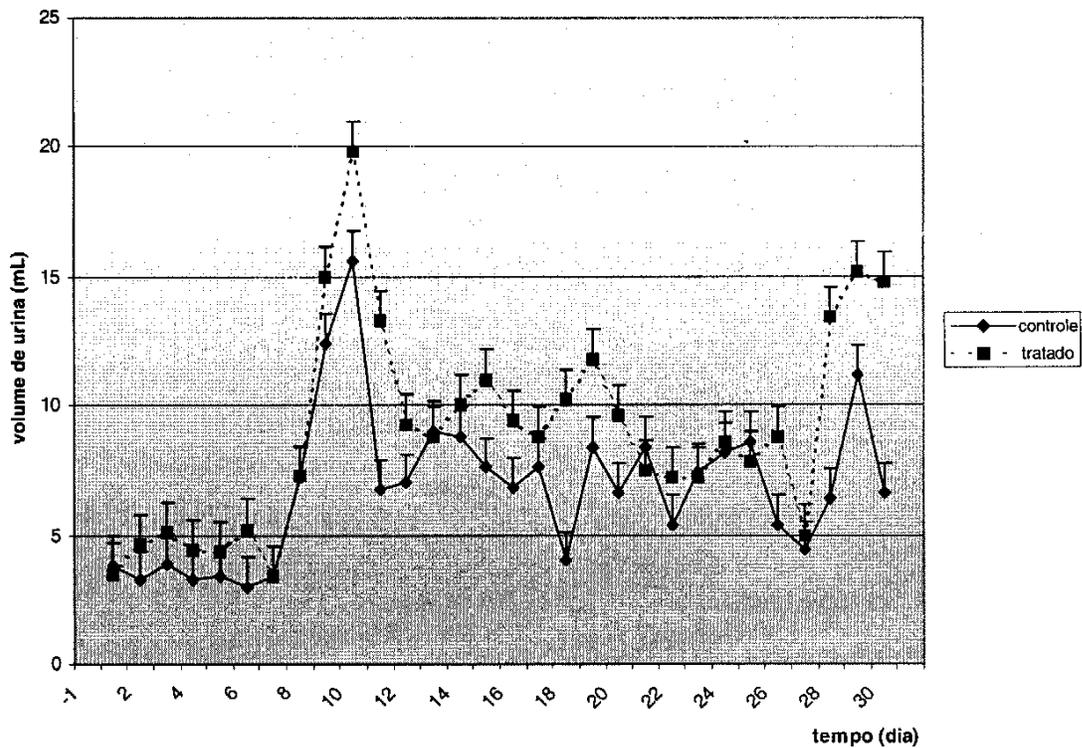


FIGURA 4. Controle da diurese dos animais tratados com o Extrato Etanólico de Própolis - EEP (650 mg/kg, v.o.) e solução de Tween 5% (grupo controle), durante trinta dias. Cada ponto representa o valor da média \pm EPM de 10 animais.

Na análise hematológica e bioquímica sangüínea, as diferenças encontradas entre o grupo tratado com o EEP (650 mg/kg, v.o.) e o tratado com solução de Tween 5% não foram significativas, nos testes estatísticos aplicados, e todos os parâmetros mantiveram-se dentro dos padrões de referência para a espécie animal utilizada neste estudo (Tabela 3).

TABELA 3. Parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais tratados com o Extrato Etanólico de Própolis - EEP (650 mg/kg, v.o.), e solução de Tween 5% (controle) durante 30 dias.

PARAMETROS	CONTROLE	TRATADO
GLICOSE (mg/dl)	79,8 ± 9,1	80 ± 7,9
TGO (U/ml)	64 ± 15,5	54,8 ± 4,7
TGP (U/ml)	41 ± 4,3	35,8 ± 3,8
UREIA (mg/dl)	45,4 ± 6,1	41,8 ± 2,6
CREATININA (mg/dl)	0,3 ± 0,06	0,4 ± 0,03
ERITÓCITOS ($\cdot 10^9/mm^3$)	5,1 ± 0,3	4,8 ± 0,3
HEMOGLOBINA (mg/dl)	12,1 ± 0,6	11,3 ± 0,9
HEMATÓCRITO (%)	42,7 ± 1,7	41,2 ± 1,7
VCM (fl)	83,8 ± 3,7	86,5 ± 2,1
HCM (pg)	23,6 ± 1,2	23,5 ± 0,6
CHCM (%)	28,3 ± 0,8	27,2 ± 1,0
NEUTRÓFILO ($/\mu L$)	1575,7 ± 313	2073,2 ± 584,9
EOSINÓFILO ($/\mu L$)	61,5 ± 41,6	137,6 ± 35,8
LINFÓCITO ($/\mu L$)	5825,5 ± 246,4	3614,4 ± 694,7
PLAQUETA ($/\mu L$)	618,3 ± 35,7	472,6 ± 43,3

Os valores representam a média \pm EPM de cada grupo (n = 5)

No teste "U" de Mann - Withney e teste "t" de Student, as diferenças não foram estatisticamente significativas.

Nos exames microscópicos dos tecidos estomacais dos animais dos grupos controle, tratado somente com solução de Tween 80 a 5%, e o tratado com o EEP (650 mg/kg, v.o.) não foram encontradas alterações na mucosa, na parede gástrica, como também alteração ao nível de mucosa e suas células, e de parede gástrica. Não foram observadas lesões, hemorragias ou infiltrado de células. O mesmo fato se repetiu quando analisado o tecido esofágico, intestino grosso, pulmonar, baço, e cardíaco tanto do grupo controle, quanto do grupo tratado com o EEP, ou seja, não foram encontradas quaisquer alterações dignas de nota.

A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que o EEP apresenta efeito antiinflamatório semelhante ao dos antiinflamatórios não esteroidais; entretanto, no que se refere a danos na mucosa gástrica e outros ao nível sanguíneo, este mostrou não interferir de forma significativa.

AGRADECIMENTOS:

Os autores agradecem a ajuda técnica de Alberto Van de Kamp do Laboratório de Fitofármacos da Universidade de Alfenas, e o auxílio financeiro da Apis Flora, para que este trabalho pudesse ser realizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive antiulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **J. Ethnopharmacol**, 30: 185-197, 1990.
- CARSON, J.L.; STRON, B.L. The gastrointestinal toxicity of the nonsteroidal antiinflammatory drugs. In: **Side-effects of antiinflammatory drugs**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1993. v.3, pp. 1-8.
- CARVALHO, J.C.T. Validação Químico-Farmacológica da Espécie Vegetal *Pterodon emarginatus* Vog. (Atividade Antiinflamatória). **Tese de Doutorado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, 184pp, 1998.
- CRHISTENSEN, H.E. **The toxic substances list**. Edition US Dept. Health Educ. Welf. USA, 1974.
- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol.**, 24: 89-102, 1972.
- GALLO, F.R.; SAVI, G. Propoli: usi e tecniche di rilevazione. **Boll. Chim. Farmaceutico**, 134: 483-491, 1995.
- PUTKAMMER, E. Própolis: como produzir, coletar e armazenar. **Apicultura no Brasil**, jan.-fev.: 24-27, 1987.
- RAINSFORD, K.D. The biochemical pathology of aspirin-induced gastric damage. **Agent Actions**, 5: 326-344, 1975.
- RAINSFORD, K.D.; WHITHOUSE, M.W. Non-steroid antiinflammatory drugs: Combined assay for anti-edemic potency and gastric ulcerogenesis in the same animal. **Life Sci.**, 21: 371-378, 1977.
- ROWLEY, D.A.; BENDITT, E.P. 5-hydroxytryptamine and histamine as mediators of the impury produced by agents which damage mast cells in rats. **J. Exper. Med.**, 103: 399-415, 1956.
- SOUZA, G.H.B.; ZAINAGHI, I.A.; CARVALHO, J.C.T.; SALVADOR, S.; BASTOS, J.K. Desenvolvimento de metodologia analítica em cromatografia em camada delgada e isolamento de marcadores químicos para controle de qualidade da própolis. **Revista da Universidade de Franca**, 7: 36, 1999.

Autor para correspondência:

Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho
Laboratório de Fitofármacos
Instituto de Farmácia e Nutrição
Universidade de Alfenas - Rodovia MG 179 - km 0
Caixa Postal 23 - 37130-000 - Alfenas - MG
E-mail: jctc@artefinal.com.br