

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO RENORBIO**

**JACQUELINE ARANTES DINIZ BASÍLIO**

**Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da atividade cicatrizante de membranas  
poliméricas incorporadas com própolis vermelha**

**MACEIÓ – AL  
2018**

**JACQUELINE ARANTES DINIZ BASÍLIO**

**Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da atividade cicatrizante de membranas  
poliméricas incorporadas com própolis vermelha**

Tese apresentada ao **Programa de Pós-Graduação RENORBIO** da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do título de **DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA. Área de concentração: BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE.**

Orientadora: Profa. Dra. Marília Oliveira  
Fonseca Goulart

**MACEIÓ – AL  
2018**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecário: Marcelino de Carvalho

B312d Basílio, Jacqueline Arantes Diniz.  
Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da atividade cicatrizante de  
membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha / Jacqueline  
Arantes Diniz Basílio. – 2018.  
113 f. : il. color.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.  
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade  
Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO.  
Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 103-113.

1. Biopolímeros - Membrana. 2. Própolis. 3. Cicatrização de ferimentos.  
I. Título.

CDU:616-003.9:638.135

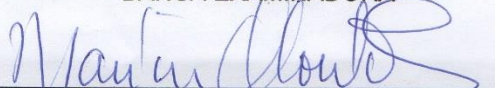
JACQUELINE ARANTES DINIZ BASÍLIO

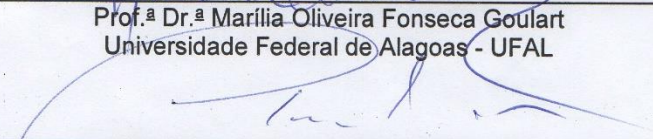
**Desenvolvimento e avaliação *in vitro* da atividade cicatrizante de membranas poliméricas incorporadas com própolis vermelha**

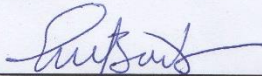
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

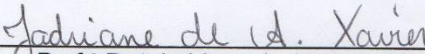
Aprovada em: 1º/11/2018.

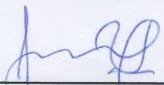
BANCA EXAMINADORA

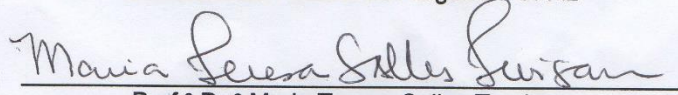
  
Prof.ª Dr.ª Marília Oliveira Fonseca Goulart  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

  
Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam  
Universidade Federal de Sergipe - UFS

  
Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

  
Prof.ª Dr.ª Jadriane de Almeida Xavier  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

  
Prof. Dr. Josealdo Tonholo  
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

  
Prof.ª Dr.ª Maria Teresa Salles Trevisan  
Universidade Federal do Ceará - UFC

## DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese aos meus pais Gladistony Arantes e Maria Nailde Arantes, pelo incansável incentivo para minha formação pessoal e acadêmica;*

*Aos meus irmãos Juliana e Gladistony Jr por compreender a minha ausência em momentos importantes de suas vidas;*

*Ao meu esposo Irinaldo Jr pela compreensão, presença, incentivo, dado na minha formação pessoal e acadêmica. Sem voce nada disso seria possível meu amor. Te amo e meu muito obrigada;*

*Ao meu filho Luis Henrique por me proporcionar alegrias em momentos difíceis desta fase de minha vida. Seu sorriso sempre foi e sempre será minha alegria;*

*Ao meu caçulinha Vitor mesmo tão pequenino os aconchegos dos seus abraços foram essenciais para a sua mamãe tornar essa jornada mais suave*

*Aos meus mestres da academia e da vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional durante essa caminhada. Pelas conquistas, êxitos e principalmente pelos momentos de dificuldade onde aprendi a ser mais forte, determinada e não desistir facilmente dos meus objetivos. Por me cercar de pessoas que acreditam nos meus sonhos e que estão dispostas a me ajudar mesmo sem receber nada em troca, por me mostrar que tudo fica mais fácil se trabalhamos em equipe.

À minha família pelo amor, incentivo e torcida. Por compreenderem e aceitarem minha ausência física em diversos momentos. Mesmo longe, todos vocês se fizeram presentes tanto nos momentos felizes quanto nos momentos de dificuldade e aflição. Aos meus pais Gladistony e Nailde pelo apoio incondicional, por suportarem a distância e por não medirem esforços para tornarem meus sonhos realidade. Agradeço também aos meus irmãos Júnior e Juliana, que tanto torcem e vibram com minhas conquistas.

Ao meu esposo Irinaldo Júnior, pelo amor, carinho, atenção, paciência e companheirismo de sempre. Por estar sempre ao meu lado nos momentos alegres, mas principalmente, naqueles mais desafiadores ou angustiantes, sempre pronto a ajudar. Por acreditar no meu potencial até mais do que eu mesma, por me dar coragem, segurança e me mostrar que sou capaz. Muito obrigada por tudo. Essa conquista também é sua. Amo muito você.

Aos meus filhos Luís Henrique e Vitor Arantes por me proporcionarem alegrias diárias sou a grata a Deus por tê-los. Vocês são o melhor de mim. Mamãe ama muito vocês.

Aos meus amigos de trabalho que por diversas vezes me apoiaram em todos os sentidos, meu muito obrigada, Elvya Lylyan, Ticiane Rosa, Genilza Ferreira Gomes, Thycia Cerqueira, Maria Izabel, João Tenório Neto.

E aos amigos que fiz durante o doutorado, que sem eles nada disso seria possível meu muito obrigada a Jadriane Xavier pessoa iluminada que por diversas vezes me fez enxergar o quanto seria importante pra mim passar por essa longa caminhada, Júnia Porto outro ser de luz que com suas doces palavras me fizeram chegar até aqui, Jéssika Lane, Mônica, Mariana, Fabiana Santos e a todos do LEQUI por momentos de descontração.

À Profa DrRose Naal por oportunizar a possibilidade de realização dos experimentos de atividade antialérgica das membranas. Para a professora dedico tudo...

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart, não só pela orientação, mas também por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho, por me incentivar e me tranquilizar nos momentos de dificuldade, ansiedade e angústia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela concessão da bolsa de doutorado, assim como ao Ministério da Saúde que através da parceria com a FAPEAL apoiou com o programa PPSUS.

A Universidade Federal de Alagoas por autorizar a realização das análises e pela oportunizar a realização deste doutorado.

**MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS**

*“A realidade de hoje foi o sonho de ontem;  
o sonho de hoje será a realidade de amanhã; em  
todas as épocas zombou-se dos sonhadores”.*

*Zákind Piatigórsky*

## RESUMO

As lesões cutâneas são processos altamente complexos e dinâmicos que envolvem fenômenos bioquímicos e fisiológicos. As lesões cutâneas representam um grande desafio para os profissionais de saúde, com necessidade de desenvolver recursos mais acessíveis, eficientes e rentáveis no tratamento de feridas. Um dos principais desafios é a substituição de tecidos lesados do corpo por biopolímeros biocompatíveis, conhecidos por possuírem propriedades curativas e serem abundantes na natureza, tornando seu uso atrativo para a confecção de curativos para lesões cutâneas. A inclusão de agentes terapêuticos de origem natural em bases poliméricas surge como uma alternativa para o tratamento de feridas. Nesse contexto, destacamos a própolis vermelha, com variadas e importantes atividades biológicas. Neste estudo, procuramos desenvolver membranas biopoliméricas enriquecidas com o extrato etanólico da própolis vermelha (EPPV) e avaliar sua atividade cicatrizante *in vitro*. Membranas biopoliméricas de carboximetilcelulose (CMC)-pectina foram obtidas com inclusão de EPPV, em uma concentração de 10%. A adição de EERP na mistura de polímeros foi considerada satisfatória. Não houve alterações na aparência, com exceção da cor, típica da própolis vermelha, na morfologia das membranas, capacidade de absorção de fluidos e resultou em alta eficiência de incorporação e controle cinético apropriado da liberação de flavonóides totais com um platô a 240 min. Os resultados cromatográficos mostraram 6 flavonóides principais: Daidzeína, Pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina, bolusontol e Biochanina. Além disso, as formulações apresentaram alto potencial antioxidante *in vitro* (FRAP- 147,8 mmol de Fe (II) g<sup>-1</sup> para EERP; potencial de eliminação de radicais livres de DPPH - IC<sub>50</sub> 43,70 g mL<sup>-1</sup>). Para resposta alérgica, foi utilizado o ensaio da β-hexosaminidase, amplamente utilizado para monitorar a degranulação de mastócitos. As membranas desenvolvidas mostraram não ter propriedades alergênicas. Uma boa atividade cicatrizante também foi observada *in vitro*, pela avaliação da migração de fibroblastos, uma vez que essas membranas apresentaram fechamento acelerado de 20% da ferida. Assim, podemos concluir que as membranas enriquecidas com EERP provaram ser uma ótima opção para o reparo de lesões e podem ser úteis na obtenção de produtos eficientes e de baixo custo, contribuindo para tratamentos de saúde alternativos e complementares.

**Palavras-chave:** Biopolímeros. Própolis vermelha. Membranas. Cicatrização.

## ABSTRACT

Skin lesions are highly complex and dynamic processes that involve biochemical and physiological phenomena. The skin lesions represent a major challenge for health professionals, with need to develop more accessible, efficient and cost effective resources in the treatment of wounds. One of the major challenges is the replacement of injured tissues of the body with biocompatible biopolymers, which are known for having healing properties and because they are abundant in nature, making their use, attractive for the fabrication of dressings for skin lesions. The inclusion of therapeutic agents of natural origin in polymeric bases arises as an alternative for the treatment of wounds. In this context, we highlight the red propolis, with varied and important biological activities. In this study, we sought to develop biopolimeric membranes enriched with the ethanolic extract of red propolis (EERP) and evaluate its healing activity in vitro. Biopolimeric membranes of carboxymethylcellulose (CMC)-pectin were obtained with the inclusion of EERP, at a concentration of 10%. The addition of EERP at the polymer mixture was considered satisfactory. There were no changes in appearance, with the exception of the color, typical of red propolis, on the morphology of the membranes, fluid absorption capacity and resulted in high efficiency of incorporation and appropriate kinetic control of release of total flavonoids with a plateau at 240 min. The chromatographic results showed 6 major flavonoids: Daidzein, Pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina, bolusontol and Biochanin A. Additionally, the formulations presented a high antioxidant potential in vitro (FRAP- 147.8 mmol of Fe(II) g<sup>-1</sup> for EERP; radical scavenging potential from DPPH – IC<sub>50</sub> 43.70 g mL<sup>-1</sup>). For allergic response, the  $\beta$ -hexosaminidase assay, widely used to monitor mast cell degranulation was used. The developed membranes were shown to have no allergenic properties. A good healing activity was also observed in vitro, by fibroblast migration assessment, once those membranes showed an accelerated closing of 20% of the wound. Thus, we can conclude that the membranes enriched with EERP have proven to be a great option for the repair of injuries and may be useful in obtaining efficient and low-cost products, contributing for alternative and complementary health treatments.

**Keywords:** Biopolymers. Red propolis. Membranes. Cicatrization.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Própolis Vermelha de Alagoas – Apiário Marechal Deodoro/AL.....                                                                                                                              | 30 |
| Figura 2 - Estrutura química básica de um flavonóide. ....                                                                                                                                              | 33 |
| Figura 3 – Alguns flavonóides encontrados na própolis. ....                                                                                                                                             | 35 |
| Figura 4 – Corte de pele humana.....                                                                                                                                                                    | 37 |
| Figura 5 - Fases da ferida: (a) inflamação, (b) granulação e (c) repitelização. ....                                                                                                                    | 39 |
| Figura 6 - Fases da cicatrização.....                                                                                                                                                                   | 40 |
| Figura 7– Estrutura da celulose. ....                                                                                                                                                                   | 47 |
| Figura 8 - Estrutura química do CMC.....                                                                                                                                                                | 48 |
| Figura 9 - Representação esquemática da estrutura primária da pectina (HAMMAN, 2010). ....                                                                                                              | 49 |
| Figura 10 – Própolis coletada no município de Marechal Deodoro-AL. ....                                                                                                                                 | 50 |
| Figura 11– Coleta da própolis nas caixas de abelha.....                                                                                                                                                 | 64 |
| Figura 12– Extrato Etanólico de Própolis Vermelha.....                                                                                                                                                  | 66 |
| Figura 13 - Espectros de FTIR para o extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV). ....                                                                                                                | 67 |
| Figura 14 – Espectro de absorção na região do UV-vísivel do EEPV da própolis vermelha. ....                                                                                                             | 69 |
| Figura 15 - Perfil cromatográfico do extrato etanólico da própolis vermelha.....                                                                                                                        | 75 |
| Figura 16 – Características macroscópicas das membranas preparadas com EEPV.....                                                                                                                        | 76 |
| Figura 17 – Fotomicrografia da superfície das membrana com (A) e sem (B) a presença de EEPV, obtida por MEV com aumento de 125x.....                                                                    | 78 |
| Figura 18 - Dinâmica de molhabilidade das membranas com a presença e sem a presença de própolis vermelha. ....                                                                                          | 80 |
| Figura 19- Cinética de intumescimento em PBS (0,9%) a 37°C das membranas preparadas na ausência e na presença do EEPV.....                                                                              | 82 |
| Figura 20 - Espectros de FTIR para o extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) e membrana à base de EEPV.....                                                                                       | 84 |
| Figura 21- Perfil de liberação de flavonóides totais da membrana em função do tempo.....                                                                                                                | 86 |
| Figura 22 – Reação de produção do N-acetilglucosaminida e metilumbeliferona a partir do metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-Glucosaminida. ....                                                       | 87 |
| Figura 23 - Porcentagem de $\beta$ -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 $\mu$ g/mL) na presença de diferentes concentrações de inibidores (EPV e MEPV). .... | 88 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 24 - Efeito do tratamento com própolis vermelha ou própolis vermela sobre a migração de fibroblastos in vitro.....                                                                                                                                                                                                                             | 89 |
| Figura 25 - Fotomicrografias representativas do efeito da própolis vermelha ou própolis vermelha/Aloe-vera sobre a migração de fibroblastos in vitro. As setas indicam a área livre de células no tempo de 24h comparado ao respectivo tratamento no tempo de 0h. As imagens foram obtidas em microscopia de contraste de fase, aumento de 100X. .... | 90 |

## LISTA DE EQUAÇÕES

|                |    |
|----------------|----|
| Equação 1..... | 58 |
| Equação 2..... | 64 |
| Equação 3..... | 65 |
| Equação 4..... | 66 |
| Equação 5..... | 69 |
| Equação 6..... | 70 |
| Equação 7..... | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Classificação da própolis vermelha de acordo com as características físico-químicas e localização .....                                                              | 31 |
| Tabela 2. Classe, estrutura química e fontes de flavonoides. ....                                                                                                               | 33 |
| Tabela 2. Classe, estrutura química e fontes de flavonoides. (Continuação) .....                                                                                                | 33 |
| Tabela 3- Relação dos componentes das membranas poliméricas de EEPV. ....                                                                                                       | 55 |
| Tabela 4 - Identificação de qualidade da própolis (n=3). ....                                                                                                                   | 64 |
| Tabela 5- Rendimento do extrato etanólico da própolis vermelha. ....                                                                                                            | 67 |
| Tabela 6- Rendimento do extrato etanolico da própolis vermelha. ....                                                                                                            | 70 |
| Tabela 7 - Capacidade antioxidante de extratos do EEPV através da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH● e capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP) .....      | 73 |
| Tabela 8– Identificação dos marcadores da própolis vermelha por CLAE-FR. ....                                                                                                   | 74 |
| Tabela 9- Comparação dos aspectos macroscópicos das membranas. ....                                                                                                             | 76 |
| Tabela 10 - Espessura das membranas em µm com e sem a presença de EEPV. ....                                                                                                    | 79 |
| Tabela 11 – Teor de umidade das membranas. ....                                                                                                                                 | 80 |
| Tabela 12 - Grau de intumescimento das membranas em relação ao tempo de intumescimento (n=3). ....                                                                              | 82 |
| Tabela 13- Tabela da relação entre os valores das bandas de absorção no FTIR e os grupos químicos encontrados nas formulações atomizadas e o extrato de própolis vermelha. .... | 84 |
| Tabela 14 - Eficiência de incorporação de EEPV nas membranas. ....                                                                                                              | 85 |
| Tabela 15- Quantificação de conteúdo de flavonóides totais liberados pelas membranas em relação ao tempo. ....                                                                  | 86 |

## **LISTA DE ABREVIações E SIGLAS**

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APL - Arranjo Produtivo Local

ASR - Atividade sequestradora do radical

ATR - Reflexão total atenuada

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DP - Desvio Padrão

DPPH-H - Difenil-picril-hidrazina

DPR – Desvio padrão relativo

EAG - Equivalentes de ácido gálico

EEPV – Extrato enanólico de própolis vermelha

EQ - Equivalentes de quercetina

FRAP - Capacidade antioxidante redutora de ferro

FTIR - infravermelho com transformada de Fourier

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

LABTCON - Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEPV – Membrana de extrato própolis vermelha

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MNM - Política Nacional de Medicamentos

MS - Ministério da Saúde

NaCMC - Carboximetilcelulose sódica

OMS - Organização Mundial de Saúde

PNPIC - Política de Práticas Interativas e Complementares

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RE – Resolução

RFC - Método de Folin-Ciocalteu

SQR – Substância Química de Referência

SUS - Sistema Único de saúde

UV-Vis - espectros de absorção na região

## SUMÁRIO

|          |                                                               |           |
|----------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                       | <b>20</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>                                        | <b>26</b> |
|          | 2.1 Objetivo Geral.....                                       | 26        |
|          | 2.2 Objetivos Específicos .....                               | 26        |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                            | <b>27</b> |
|          | <b>3.1 Produtos Naturais.....</b>                             | <b>27</b> |
|          | 3.1.1 Histórico do Uso de Produtos Naturais .....             | 27        |
|          | 3.1.2 . Opoterápicos.....                                     | 28        |
|          | 3.1.2 Própolis.....                                           | 29        |
|          | 3.1.3 Própolis vermelha de Alagoas .....                      | 31        |
|          | 3.1.4 Composição química da própolis vermelha.....            | 32        |
|          | 3.1.5 A pele.....                                             | 35        |
|          | 3.1.5.1 Organização estrutural da pele .....                  | 36        |
|          | 3.1.5.2 Lesões de pele .....                                  | 37        |
|          | 3.1.5.2.1 Fase inflamatória .....                             | 40        |
|          | 3.1.5.2.2 Fase proliferativa .....                            | 41        |
|          | 3.1.5.2.3 Fase de maturação ou remodelamento .....            | 41        |
|          | 3.1.6 Tratamento de lesões de pele.....                       | 42        |
|          | 3.1.7 Polímeros.....                                          | 46        |
|          | 3.1.6.1 Classificação dos Polímeros .....                     | 46        |
|          | 3.1.6.1.1 Polímeros sintéticos.....                           | 47        |
|          | 3.1.6.1.2 Polímeros Naturais.....                             | 47        |
|          | 3.1.6.1.3 Carboximetilcelulose (CMC).....                     | 47        |
|          | 3.1.6.1.4 Pectina .....                                       | 48        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                               | <b>50</b> |
|          | <b>4.1 Coleta do Material .....</b>                           | <b>50</b> |
|          | <b>4.2 Tratamento das Amostras de Própolis Vermelha .....</b> | <b>50</b> |

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>4.3 Obtenção do Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV)</b>               | 50 |
| <b>4.4 Caracterização Química do Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV)</b> | 51 |
| 4.4.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)           | 51 |
| 4.4.2 Análise dos espectros de absorção na região UV-Vis                           | 51 |
| 4.4.3 Determinação do conteúdo total de fenóis                                     | 51 |
| 4.4.4 Determinação do teor de flavonoides totais                                   | 52 |
| 4.4.5 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH●              | 52 |
| 4.4.6 Determinação da capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)             | 53 |
| 4.4.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa              | 53 |
| <b>4.5 Preparo das Membranas</b>                                                   | 54 |
| 4.5.1 Produção das membranas                                                       | 54 |
| 4.5.1.1 <i>Produção dos géis</i>                                                   | 54 |
| 4.5.1.1.1 <i>Produção de Gel de Pectina</i>                                        | 54 |
| 4.5.1.1.2 <i>Produção de gel de carboximetilcelulose</i>                           | 54 |
| 4.5.1.1.3 <i>Preparação da mistura (membrana)</i>                                  | 55 |
| <b>4.6 Caracterização das Membranas Produzidas</b>                                 | 55 |
| 4.6.1 Análise macroscópica                                                         | 56 |
| 4.6.2 Aspecto das membranas                                                        | 56 |
| 4.6.2.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>                           | 56 |
| 4.6.3 Espessura das membranas                                                      | 56 |
| 4.6.4 Umidade                                                                      | 57 |
| 4.6.5 Grau de Intumescimento                                                       | 57 |
| 4.6.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)           | 57 |
| 4.6.7 Determinação da eficiência de incorporação de EEPV nas membranas             | 58 |
| 4.6.8 Cinética de liberação de EEPV incorporado nas membranas                      | 58 |
| 4.6.9 Teste de molhabilidade                                                       | 59 |
| <b>4.7 Ensaios Biológicos</b>                                                      | 59 |
| 4.7.1 Ensaios de potencial antialérgico                                            | 60 |

|            |                                                                                                                           |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7.1.1    | <i>Preparação das células</i>                                                                                             | 60 |
| 4.7.1.2    | <i>Ensaio de potencial alérgico com emprego de biossensor baseado em mastócitos (ensaio direto)</i>                       | 60 |
| 4.7.1.3    | <i>Ensaio padrão</i>                                                                                                      | 60 |
| 4.7.1.4    | <i>Quantificação da <math>\beta</math>-hexosaminidase</i>                                                                 | 61 |
| 4.7.1.5    | <i>Inibição da atividade enzimática da <math>\beta</math>-hexosaminidase</i>                                              | 61 |
| 4.7.1.6    | <i>Viabilidade celular</i>                                                                                                | 62 |
| 4.7.2      | <i>Determinação da atividade cicatrizante in vitro</i>                                                                    | 62 |
| 4.7.2.1    | <i>Cultivo celular</i>                                                                                                    | 62 |
| 4.7.2.2    | <i>Ensaio de Migração Horizontal</i>                                                                                      | 62 |
| <b>4.8</b> | <b>Análise dos Resultados</b>                                                                                             | 63 |
| <b>5</b>   | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                             | 64 |
| <b>5.1</b> | <b>Coleta e Tratamento do Material</b>                                                                                    | 64 |
| <b>5.2</b> | <b>Extrato Etanólico de Própolis Vermelha (EEPV)</b>                                                                      | 66 |
| <b>5.3</b> | <b>Caracterização Química do Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV)</b>                                            | 67 |
| 5.3.1      | <i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>                                                 | 67 |
| 5.3.2      | <i>Análise dos espectros de absorção na região UV-Vis</i>                                                                 | 68 |
| 5.3.3      | <i>Determinação do conteúdo total de fenóis e flavonóides totais</i>                                                      | 70 |
| 5.3.4      | <i>Atividade antioxidante</i>                                                                                             | 71 |
| 5.3.4.1    | <i>Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)</i> | 72 |
| 5.3.5      | <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa</i>                                                    | 73 |
| <b>5.4</b> | <b>Preparação e Análise das Membranas</b>                                                                                 | 75 |
| 5.4.1      | <i>Aspecto e morfologia das membranas</i>                                                                                 | 75 |
| 5.4.1.1    | <i>Características Macroscópicas das Membranas</i>                                                                        | 75 |
| 5.4.1.2    | <i>Análise Morfológica</i>                                                                                                | 77 |
| 5.4.2      | <i>Espessura das membranas</i>                                                                                            | 78 |
| 5.4.3      | <i>Umidade</i>                                                                                                            | 79 |
| 5.4.4      | <i>Molhabilidade</i>                                                                                                      | 80 |

|            |                                                                                   |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.4.5      | Grau de Intumescimento.....                                                       | 81        |
| 5.4.6      | Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)..... | 83        |
| 5.4.7      | Determinação da eficiência de incorporação de EEPV nas membranas .....            | 85        |
| 5.4.8      | Cinética de liberação de EEPV incorporado nas membranas.....                      | 85        |
| <b>5.5</b> | <b>Ensaio Biológico.....</b>                                                      | <b>87</b> |
| 5.5.1      | Ensaio de potencial antialérgico .....                                            | 87        |
| 5.5.2      | Determinação da atividade cicatrizante in vitro .....                             | 89        |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                           | <b>92</b> |
| <b>7</b>   | <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                          | <b>93</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais pelo ser humano é tão antigo quanto a origem das civilizações, sendo encontrado em todas as populações, em todos os grupos étnicos conhecidos (MARTINS et al., 2003). No início dos tempos, a fitoterapia representava a principal forma terapêutica conhecida e a partir dela, foram descobertos diversos medicamentos usados na medicina tradicional (MARTINS et al., 2003).

O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia dos produtos naturais medicinais contribuiu, de forma decisiva, para a divulgação de seus efeitos medicinais, tornando-os prescritos com frequência, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (MACIEL, 2002).

A redescoberta e a revalorizaçãoda conexão entre produtos naturais e saúde tem sido responsável pelo lançamento e reativação de uma geração de produtos farmacêuticos, que incluem fitoquímicos, fármacos multicomponentes, suplementos dietéticos, alimentos funcionais, proteínas recombinantes de origem natural e outros. Estes novos produtos ou produtos antigos com novos usos já se encontram, complementando produtos farmacêuticos convencionais, no tratamento, prevenção e diagnóstico de doenças, e, ao mesmo tempo, agregam valor à biodiversidade (RASKIN et al., 2002). Outra área de grande relevância envolve a semi-síntese de derivados inspirados em produtos naturais.

No Brasil, a Política Nacional de Medicamentos (PNM) tem construído alternativas de tratamento de doenças e contribuído para a Atenção Básica de Saúde. O Ministério da Saúde (MS) tem desenvolvido e aplicado a Política de Práticas Interativas e Complementares (PNPIC) no SUS que atende às recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), que com base na evolução histórica do uso de produtos de origem natural, em 1978 passa a reconhecer a fitoterapia como terapia alternativa de eficácia comprovada. De acordo com dados da OMS, cerca de 80% da população mundial faz uso de fitoterapia, seja na forma de infuso ou medicamento ‘industrializado (TRENTINI; YAMADA, citado por CORRÊA; GRAÇA; SCHEFFER, 2004; VEIGA; PINTO; APARECIDA, 2005). Para atender às demandas de plantas medicinais foi lançado em 2016 o Memento Fitoterápico que descreve as práticas em fitoterapia no Brasil. Quando se fala de práticas em fitoterapia no Brasil, sem dúvida, nos deparamos com a existência de lacunas que comprometem o modo racional dessa terapêutica (BRASIL,2016).

Do ponto de vista econômico, os medicamentos de origem natural representam um grande benefício para a população brasileira. A comercialização de produtos obtidos de abelhas (*Apis mellifera*) como o mel e a própolis vermelha vem se tornando frequente no Brasil, com a crescente implantação de micro indústrias de produtos à base de mel e própolis.

A própolis é um produto natural que vem sendo utilizado por séculos pelas mais diversas civilizações. Pode ser definida como uma resina natural obtida através da colheita de partes de plantas e exsudatos resinosos, produzida, principalmente, por abelhas da espécie *Apis mellifera*. Essa resina é utilizada naturalmente pelas abelhas, com o intuito principal de selar eventuais aberturas nas colmeias, protegendo contra possíveis invasores (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2001; MARCUCCI, 1995).

As propriedades farmacológicas da própolis têm sido muito estudadas nesses últimos anos. Suas principais aplicações são voltadas para a criação de produtos, utilizados como tratamentos alternativos de saúde, além de poder ser utilizada na produção de medicamentos. O interesse por este produto natural está aumentando devido às suas características químicas, biológicas e farmacêuticas. Vários estudos têm demonstrado algumas propriedades da própolis, como antifúngica, antiviral, antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e antibacteriana (HU *et al*, 2005; SFORCIN, BANKOVA, 2011; VALENTE *et al*, 2011; CHAN, CHEUNG, SZE, 2013), em cicatrização de feridas (ORYAN *et al.*, 2018), entre outras.

Estudos das últimas décadas atribuem à própolis a melhora no tratamento de queimaduras, cicatrização e ulcerações. O conhecimento da ação cicatrizante da própolis é antigo, na África do Sul, por exemplo, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas.

No Brasil, as feridas constituem um sério problema de saúde pública, devido ao grande número de doentes com alterações na integridade da pele, embora sejam escassos os registros desses atendimentos. O elevado número de pessoas com feridas contribui para onerar o gasto público, além de interferir na qualidade de vida da população. No mundo, o impacto econômico e social das feridas exige um maior nível de atenção e recursos para entender os mecanismos biológicos subjacentes às complicações de ferida cutânea (SENet *et al.*, 2009).

Com o envelhecimento da população, o número de pacientes afetados por feridas vem aumentando. O verdadeiro custo do tratamento de feridas, incluindo feridas crônicas, como úlceras venosas da perna, úlceras do pé diabético e úlceras de pressão, permanece desconhecido. Uma taxa de prevalência aproximada para feridas crônicas nos países não desenvolvidos é de 1% a 2% da população geral (HEYER et al, 2016; GUEST et al, 2015).

As feridas crônicas geram sofrimento, dor, infecções graves, diversas comorbidades, isolamento social, depressão, comprometimento da saúde em geral, perda de mobilidade e aumento de custos hospitalares. Em muitos casos, podem levar à amputação do membro afetado e até morte (SITUM et al, 2014). A ferida é considerada crônica se a cura não ocorrer dentro de um período de até três meses. Cada vez mais, isso se tornou um grande desafio terapêutico em todo o mundo e é considerado um problema de saúde pública (NUNAN et al, 2014).

No Brasil, os dados estatísticos sobre feridas crônicas são escassos e atualizados com pouca frequência. Estima-se que quase 13% da população brasileira é portadora desse tipo de lesão, estatística que se eleva para quando se considerava apenas a população de diabéticos (GOMES et al., 2011; BEZERRA et al., 2014).

Apesar da variedade de curativos já comercializados, destinados ao tratamento de feridas graves e de difícil cicatrização, nenhum produto existente vai ao encontro de todos os requerimentos de um curativo ideal (MOURA et al., 2013). Os requerimentos de um curativo ideal são realizar desbridamento da ferida, evitar contaminação microbológica, promover isolamento térmico, permitir a troca gasosa, permitir sua remoção sem causar traumas na ferida e pele ao redor (BOATENG & CATANZANO, 2015). Devem garantir boa modelagem da superfície da ferida, ser atraumáticos, fazer monitoramento sem contato possível com a ferida, não produzir qualquer reação irritativa local e tóxica, admitir a esterilização, fornecer um nível máximo de conforto, ser simples na manutenção e admitir o uso a longo prazo sobre a ferida. Curativos modernos também devem produzir curativos; por esta razão, muitos deles carregam substâncias biologicamente ativas, que devem ser liberadas na ferida, em dose certa. A combinação dessas propriedades oferece uma definição do curativo "ideal", que pode ser considerado como indicativa da direção principal de pesquisa e desenvolvimento neste campo (YUDANOVA & RESHETOV, 2006).

Neste sentido, existe uma clara demanda por materiais que possam acelerar a cicatrização e reduzir os riscos de infecção ou até a morte para o paciente (WIEGAND e HIPLER, 2010). Além

disso, faz-se necessário um maior investimento em pesquisas neste campo, com o objetivo de criar recursos e tecnologias mais acessíveis à população (MANDELBAUM et al., 2003).

O desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos em determinados alvos terapêuticos é uma necessidade para se obter o sucesso terapêutico ou que demonstre benefício fisiológico à saúde na prevenção de doenças, e é tão importante quanto a descoberta das moléculas com determinada ação terapêutica.

Um dos grandes desafios atuais da cirurgia moderna tem sido a substituição de tecidos do organismo, inclusive em áreas de lesão cutânea, isso por meio do uso de implantes ou de inclusão de materiais sintéticos, de produtos artificiais ou de biomateriais.

Nos últimos anos houve um interesse crescente no uso de sistemas poliméricos como carreadores de fármacos. Estes sistemas são constituídos de polímeros biodegradáveis hidrossolúveis ou lipossolúveis, onde o fármaco é incorporado por várias técnicas.

Um biomaterial é definido como qualquer tipo de material que é usado para produzir um dispositivo farmacologicamente inerte, que pode auxiliar ou substituir uma função fisiológica do corpo, de uma maneira segura, confiável e fisiologicamente aceitável (PARK, 2012). O uso de biomateriais aumentou consideravelmente, devido a uma variedade de fatores, como o envelhecimento da população e devido a uma série de doenças congênitas e lesões. (LEVY, MARSHALL, 2004; CAMPOCCIA, MONTANARO, ARCIOLA, 2013).

As membranas, que são formadas a partir de biopolímeros capazes de produzir hidrogéis, possuem histórico de compatibilidade com organismos e têm sido muito utilizadas como curativos em feridas. Essas membranas apresentam uma maior resistência, maleabilidade e grau de reticulação variável, o que permite a formação de redes porosas com tamanho suficiente para vários tipos de aplicações (RODAS, 2004).

Os curativos são amplamente utilizados no tratamento de feridas devido à ação profunda de hidratação sobre a superfície da ferida (RODRIGUES et al., 2013). Sua capacidade para liberação controlada de fármacos é outro ponto bastante explorado, principalmente na forma de membrana polimérica. Esse fato amplia a possibilidade de desenvolvimento de curativos mais eficientes, que, além de hidratar a ferida, liberem fármacos que possam auxiliar no processo de cicatrização, ideia desenvolvida no presente trabalho.

Os fármacos ou outros materiais incorporados podem desempenhar um papel ativo no processo de cura da ferida diretamente, como agentes de limpeza ou desbridamento, para a remoção de tecido necrótico, ou indiretamente como antimicrobianos, que previnem ou tratam os agentes de infecção ou crescimento (fatores de crescimento), para ajudarna regeneração dos tecidos. Na gestão de feridas crônicas, onde os pacientes geralmente passam por tratamentos longos e mudanças frequentes dos curativos, um sistema que oferece fármacosdiretamente na ferida, de uma forma controlada, pode melhorar a adesão do paciente e os resultados terapêuticos. Bioadesivos, curativos (sintéticos, semi-sintéticos ou naturalmente derivados) poliméricos são potencialmente úteis no tratamento de infecções locais onde pode ser benéfico alcançar concentrações locais aumentadas de antibióticos, evitando altas doses sistêmicas, reduzindo assim a exposição de pacientes a um excesso de fármaco, além daquele exigido (BOATENG & CATANZANO, 2015).De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2002), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de produtos naturais no tratamento de doenças tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (DAVIS & PEREZ, 2009). Muitos produtos naturais apresentam em sua composição substâncias descritas na literatura como eficazes na atividade cicatrizante.

Neste sentido, a própolis, vem se destacando na medicina popular e atrai muita atenção por suas utilidades na prática médica e cosmética graças às suas propriedades farmacológicas, o que pode permitir sua utilização como estratégia na terapia de feridas, podendo vir a possibilitar a redução do tempo de tratamento das lesões, melhorando a condição psicossocial do paciente com sua consequente inclusão social, além de garantir o acesso mais fácil e democrático da população a tratamentos alternativos e complementares da saúde (ORYAN et al, 2018).

Desta forma, no presente trabalho, buscou-se desenvolvimento de biomembranas enriquecidas com própolis vermelha, a fim de tratar lesões na pele. Assim, este trabalho enfoca tema de relevância para a utilização de produtos de origem natural, mais especificamente na área de desenvolvimento de novos materiais, com foco no estabelecimento de processos de produção de biomateriais aplicáveis na recuperação de lesões de pele, importantes na área de biotecnologia de recursos naturais e na saúde.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar uma membrana polimérica incorporada com própolis vermelha para auxiliar no processo de cicatrização de lesões de pele.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Obter e padronizar o Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV);
- ❖ Identificar os constituintes químicos do EEPV por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV-vis;
- ❖ Desenvolver formulações de membranas poliméricas e incorporação do EEPV;
- ❖ Caracterizar o extrato das membranas obtidas a partir da própolis vermelha. Aplicação da espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR);
- ❖ Quantificar o teor de fenóis e flavonóides totais do extrato das membranas obtidas a partir da própolis vermelha;
- ❖ Avaliar a capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e redutora de ferro (FRAP) do EEPV e das membranas obtidas a partir da própolis vermelha;
- ❖ Avaliar a morfologia da superfície das membranas obtidas a partir da própolis vermelha através da Aplicação da microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- ❖ Avaliar o comportamento hídrico, através da determinação do grau de intumescimento (*swelling behavior*) das membranas poliméricas desenvolvidas à base de própolis vermelha;
- ❖ Aplicar UV-Vis na determinação da eficiência de incorporação de EEPV nas membranas;
- ❖ Aplicar modelos *in vitro* para a determinação do potencial antialérgico e de viabilidade celular das membranas obtidas a partir da própolis vermelha;
- ❖ Aplicar ensaios de cicatrização *in vitro* para a determinação da atividade cicatrizante das membranas obtidas a partir da própolis vermelha.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Produtos Naturais**

##### **3.1.1 Histórico do Uso de Produtos Naturais**

O uso terapêutico dos produtos naturais na saúde humana constitui-se como prática milenar, historicamente construída na sabedoria do senso comum que articula cultura e saúde, uma vez que esses aspectos não ocorrem de maneira isolada, mas inseridos num contexto histórico determinado. Mesmo com os expressivos avanços científicos da fitoterapia, como são conhecidas as plantas utilizadas para fins terapêuticos na linguagem acadêmica, elas continuam sendo muitas vezes usadas apenas com base na cultura popular para a promoção e recuperação da saúde das pessoas (ALVIM, 2006; ALEXANDRE, 2008).

No Brasil, esta prática foi introduzida pelos indígenas, que utilizavam seus conhecimentos empíricos para uso das plantas na cura das doenças endêmicas de suas tribos. É fato que até os dias atuais os estudos sobre as formas, uso e terapêutica dos produtos naturais tem se tornado muito importante e que ainda existe muito a se estudar, pois de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população faz uso desses produtos naturais no que tange a atenção primária à saúde (CUNHA, 2011; BRASIL, 2012).

O uso de produtos naturais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades. Estudos envolvendo seu uso demonstram uma grande dimensão e conscientização através da aplicação empírica da fitoterapia entre a população. No Brasil, essa prática terapêutica alternativa serve para o tratamento de muitas enfermidades, já que a descoberta de novos medicamentos baseados em produtos naturais tem sido enfatizada pela indústria farmacêutica (SOUSA et al., 2011; GEARY et al., 2012).

As plantas são consideradas a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Pelo menos 25% dos medicamentos atuais são produzidos direta ou indiretamente a partir de alguma planta. No Brasil este segmento responde por 3% a 4% do faturamento anual do setor farmacêutico. Os fitomedicamentos são responsáveis por 6% do faturamento de todo o segmento de medicamentos no mundo (RODRIGUES et al, 2012).

Na Segunda Guerra Mundial, muitos produtos naturais foram utilizados como agentes clínicos (PHILLIPSON, 2001). Após a grande Guerra, os conhecimentos na área de fitoterapia

estimularam o desenvolvimento de drogas sintéticas que eram produzidas a partir de moléculas encontradas naturalmente nos vegetais (GILBERT et al., 1997). O conhecimento adquirido e acumulado pelas civilizações, que usam as plantas no tratamento de enfermidades, representa a base da fitoterapia moderna e ponto de partida para pesquisas e produção de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas.

O fim do século XX e o início do século XXI foram marcados pelo grande avanço na ciência e da tecnologia e pelos impactos que estas causaram na medicina. No entanto, apesar de todo esse desenvolvimento, em diversos casos, a medicina ainda se mostra incapaz de resolver os problemas de saúde. Apesar de altas tecnologias terem sido incorporadas aos sistemas de diagnóstico e da terapêutica, pesquisas mostram que cresce a insatisfação das pessoas com os custos dos tratamentos, com a falta de humanização em saúde, além da suspeita sobre a eficácia de alguns procedimentos médicos (FIGUEIREDO; OLIVEIRA, 2003).

Nota-se um retorno do interesse pelas plantas medicinais, devido à grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficiência de alguns produtos sintéticos, ao alto custo dos medicamentos alopáticos e à busca da população por tratamentos menos agressivos ao organismo (BADKE et al., 2012).

### 3.1.2 . Opoterápicos

Opoterápicos são definidos como “preparação obtida a partir de glândulas, tecidos, outros órgãos e secreções animais destinada a fim terapêutico ou medicinal”, como exemplo de medicamento, a própolis (produzida por abelhas) (BRASIL, 2011).

Nos últimos anos tem crescido o interesse por produtos de fontes naturais para uso farmacêutico, principalmente no que se refere a fitoterápicos e particularmente a opoterápicos. O Brasil ocupa uma posição privilegiada, possuindo cerca de 30% da flora mundial (BRESSOLIN; CECHINEL FILHO, 2003).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a “própolis” é um produto natural, de características físicas resinosas e composição variável, coletada de várias espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha, sendo classificada como opoterápico” (BRASIL, 2005).

Atualmente, o estado de Alagoas apresenta um Arranjo Produtivo Local (APL) na área de apicultura. A prática das medicinas naturais e alternativas tem direcionado um interesse cada vez

maior sobre os produtos apícolas/opoterápicos, assumindo grande importância em pesquisas, dentre eles a própolis.

### 3.1.2 Própolis

A *Apis mellífera* é a principal espécie de abelhas produtoras da própolis. Destaca-se por ser uma espécie bastante eficiente na polinização das plantas e na elaboração de mel, geleia real, cera e própolis. De cada colmeia pode-se coletar entre 100 a 300 gramas de própolis por ano (PEREIRA et al, 2003).

A própolis é um produto natural que vem sendo utilizado por séculos, pelas mais diversas civilizações, sob as mais diferentes formas de administração. Suas aplicações já eram descritas por gregos, romanos e egípcios. No Egito, por exemplo, a própolis era utilizada para embalsamar corpos e era chamada de “cera negra”. Além disso, os gregos incluindo Hipócrates, já utilizavam a própolis, como principal agente cicatrizante da época (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2001).

A palavra própolis é derivada do grego *pro* – para ou em defesa, e *polis* – a cidade, dando o significado de “em proteção da colmeia” (GHISALBERTI, 1979). As abelhas usam esta substância para protegê-las contra insetos e micro-organismos, empregando-a em finas camadas nas paredes internas das colmeias para vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colmeia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (MARCUCCI, 1995; LUSTOSA et al., 2008).

A própolis é um material resinoso coletado por abelhas, principalmente de brotos de folhas, brotos de flores, caules, frutos rachados na casca de várias espécies de árvores, transportados para a colmeia e misturados com cera para formar materiais adesivos fortes (ORLANDINI, PINETTI, BENVENUTI, 2011).

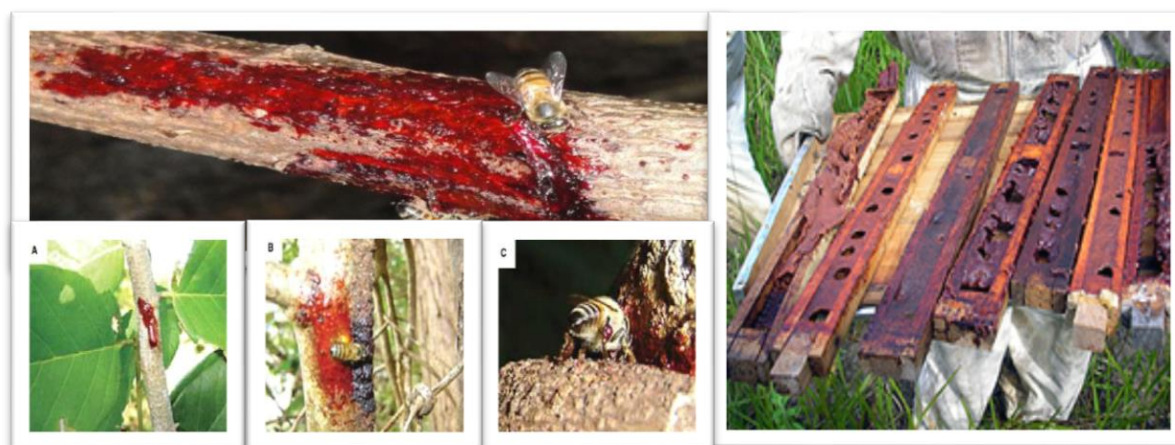
Sua composição é variada, apresentando majoritariamente de 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen (LUSTOSA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2018). A porção resinosa e balsâmica é rica em compostos fenólicos e esses têm sido apontados como os responsáveis pelos efeitos terapêuticos atribuídos à própolis. Dentre esses compostos, os flavonoides são considerados os principais, sendo possível encontrar, ainda, ácidos fenólicos, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas. A composição e a proporção dos componentes encontrados na própolis variam de acordo com a vegetação local, a estação do ano

em que foi feita a colheita e até mesmo de acordo com a variabilidade genética das abelhas rainhas (PARK et al., 1998).

Park, Ikegaki e Alencar (2000) classificaram a própolis em doze grupos diferentes, baseado em uma série de estudos físico-químicos (Tabela 1). A classificação foi feita após análises, como a aparência e coloração do extrato e espectro de absorção no UV-visível, realizados em 500 amostras de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. O mesmo estudo sugeriu que a diversidade da própolis crescia na mesma proporção que a vegetação das regiões também aumentava. Posteriormente, Dausch e colaboradores (2006) relataram a descoberta da própolis vermelha e sua classificação como a própolis do grupo treze. Cinco tipos são provenientes da região sul, um proveniente do sudeste e centro-oeste e sete do Nordeste.

A própolis vermelha é obtida no nordeste do Brasil, em regiões localizadas nas proximidades de mar, rios e manguezais, mais precisamente da região de mangue do estado de Alagoas. Esse tipo de própolis tem uma composição diferente em relação aos outros tipos. Sua coloração vermelha ocorre devido à sua origem botânica, que foi descoberta após pesquisadores observarem que as abelhas coletavam um exsudato vermelho da leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (DAUGSCH et al., 2006) (Figura 1), conhecida popularmente como rabo de bugio, devido à sua coloração vermelha intensa.

**Figura 1 - Própolis Vermelha de Alagoas – Apiário Marechal Deodoro/AL.**



Fonte: [www.propolisdealagoas.blogspot.com](http://www.propolisdealagoas.blogspot.com) – Acesso em 19 de maio de 2018.

**Tabela 1 – Classificação da própolis vermelha de acordo com as características físico-químicas e localização**

| Extrato etanólico de própolis |                            |                 |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------|
| Grupo*                        | Cor                        | Origem          |
| 1 (RS)                        | Amarela                    | Região Sul      |
| 2 (RS)                        | Marrom                     | Região Sul      |
| 3 (PR)                        | Marrom escura              | Região Sul      |
| 4 (PR)                        | Marrom                     | Região Sul      |
| 5 (PR)                        | Marrom esverdeada          | Região Sul      |
| 6 (BA)                        | Marrom avermelhada         | Região Nordeste |
| 7 (BA)                        | Marrom esverdeada          | Região Nordeste |
| 8 (PE)                        | Marrom escura              | Região Nordeste |
| 9 (PE)                        | Amarela                    | Região Nordeste |
| 10 (CE)                       | Amarela escura             | Região Nordeste |
| 11 (PI)                       | Amarela                    | Região Nordeste |
| 12 (SP)                       | Verde ou marrom esverdeada | Região sudeste  |
| 13 (AL)                       | Vermelha                   | Região Nordeste |

Fonte: Adaptado de PARK *et al.*, 2000; CABRAL *et al.*, 2009; TORETI *et al.*, 2013.

### 3.1.3 Própolis vermelha de Alagoas

A própolis vermelha é reportada como sendo típica de Cuba e da Venezuela, onde as origens botânicas foram identificadas como *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) e *Clusia scrobiculata*, respectivamente (TRUSHEVA *et al.*, 2006).

A própolis vermelha de Alagoas (Figura 1) recebeu, em 2012, o registro de Indicação Geográfica (IG201101) pelo INPI, delimitando o Estado em 17 pontos, os quais abrangem as áreas de manguezais, denominando assim a origem da própolis de Alagoas.

*“A “Própolis Vermelha de Alagoas” (PVA) é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, de brotos, flores e exsudatos predominantemente da planta *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae, nome popular: Rabo de Bugio), de ocorrência na região litorânea e estuarino-lagunar do Estado de Alagoas, acrescidos das secreções salivares desses insetos, além de cera e pólen, para elaboração final do produto cuja composição apresente, entre outros compostos químicos, medicarpina, vestitol, isoliquiritigenina, formononetina e dadzeína (LOPEZ et al., 2001).”*

#### 3.1.4 Composição química da própolis vermelha

A composição química da própolis é muito complexa e depende da biodiversidade da flora regional, mas de forma geral ela é constituída de aproximadamente 30% de ceras, 50% de resinas vegetais, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, incluindo compostos orgânicos e microelementos.

Mais de 300 compostos químicos já foram identificados, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais terpenos (BANKOVA, 2005; FUNARI & FERRO, 2006; HUANG et al., 2014).

A própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades, antimicrobiana, antiparasitária, antifúngica, antiviral, imunoestimulante, antioxidante, antitumoral, entre outras, (LUSTOSA et al., 2008). Essas atividades atribuídas à própolis são relacionadas aos seus marcadores, no caso da própolis vermelha de Alagoas, essas atividades se atribuem principalmente aos isoflavonóides, ácidos fenólicos, gutiferas e terpenos (LÓPEZ et al., 2014).

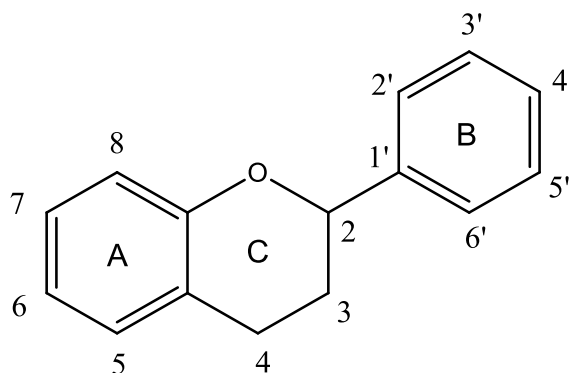
Dentre esses compostos, os flavonóides são considerados os principais responsáveis pelos efeitos terapêuticos da própolis, possuindo ação antibacteriana, antiviral, antioxidante, cicatrizante, imunomoduladora, antiinflamatória, analgésica, regenerativa de cartilagens e ossos e vasodilatadora (CHEN et al., 2005; MENEZES, 2005; FERNANDES JUNIOR et al., 2006; VOLPI & BERGONZINI, 2006; SPERANÇA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2012).

Os flavonoides são classificados como compostos fenólicos que podem estar presentes na forma de agliconas, glicosídeos ou como parte de estruturas que possuem flavonoides. O principal

flavonoide presente na dieta humana é a quercetina. Os mecanismos antioxidantes dos flavonoides envolvem sua capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) e sua capacidade de quelar íons metálicos, promovendo então a proteção do tecido contra ERON e contra a peroxidação lipídica (BEHLING et al., 2004).

A estrutura química dos flavonóides está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, denominado de núcleo flavana (Figura 2). Devido ao fato do terceiro anel apresentar-se como uma pirona, ocorre a formação das flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, chalconas e auronas, recebendo a denominação de núcleo 4-oxo-flavonóide (AHERNE, O'BRIEN, 2002).

**Figura 2 - Estrutura química básica de um flavonóide.**

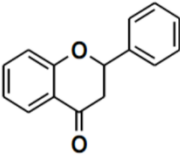
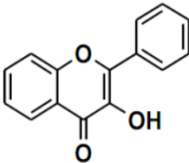
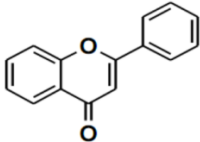
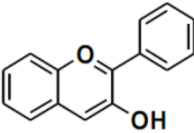


Fonte: MARÇO et al., 2008.

**Tabela 2. Classe, estrutura química e fontes de flavonoides.**

| CLASSE    | ESTRUTURA                                                                                  | NOME                                                                                       | FONTE                                                   |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Flavanóis | <div>OH no C-3, sem<br/>dupla ligação<br/>entre<br/>C-2 e C3,<br/>sem C=O no<br/>C-4</div> | <div>Epicatequina<br/>Catequina<br/>Epigallocatequina<br/>Galato de<br/>Epicatequina</div> | <div>Cha verde,<br/>preto, uvas e vinho<br/>tinto</div> |

**Tabela 3. Classe, estrutura química e fontes de flavonoides. (Continuação)**

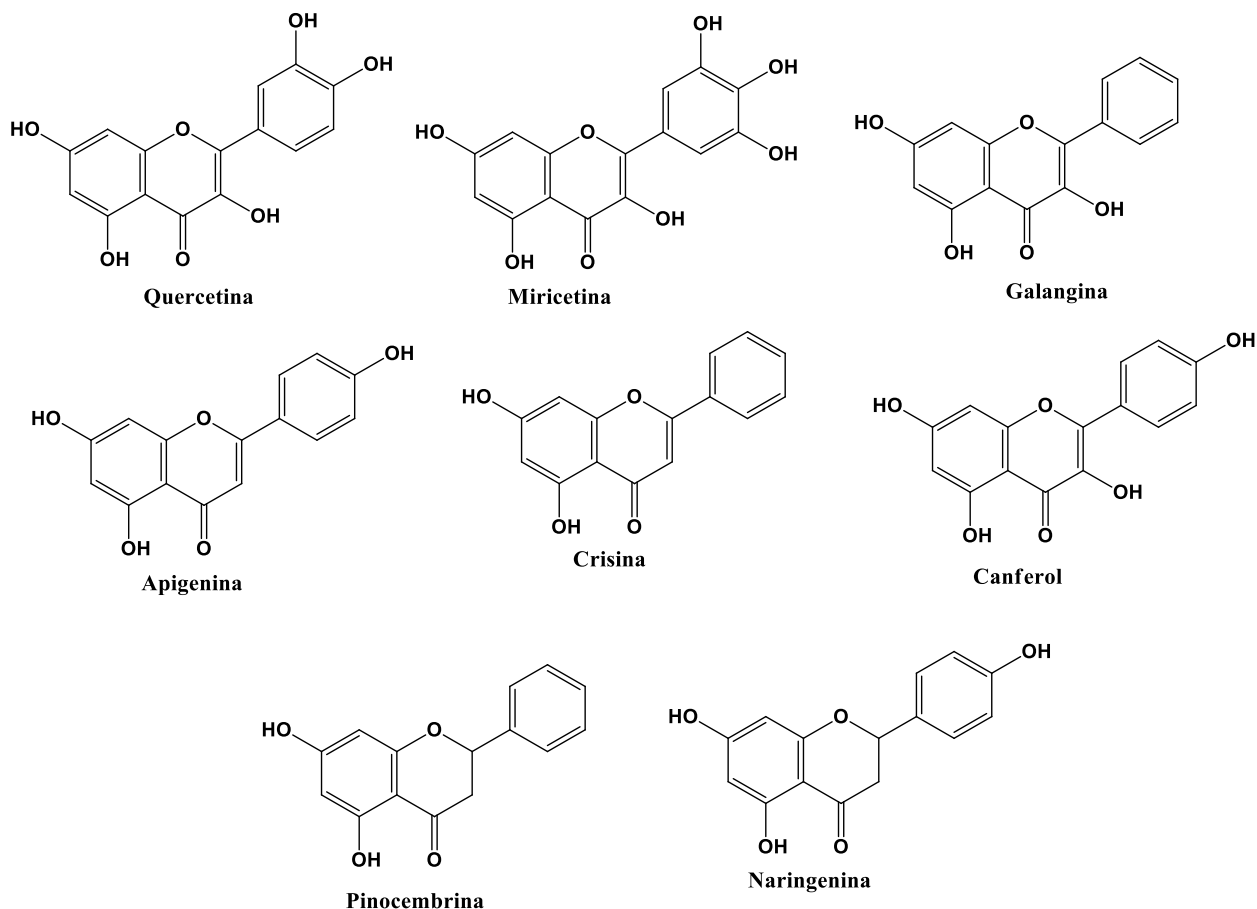
|                |                                                                       |                                                                                    |                                                 |                                                                                             |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Flavanona      | C=O no C-4 sem<br>dupla ligação<br>entre<br>C-2 e C-3                 |   | Nariginina<br>Taxofolina                        | Cascas e frutas<br>cítricas                                                                 |
| Flavonóis      | OH na<br>posição 3 e<br>C=O na<br>posição 4 do<br>anel C              |   | Campferol<br>Quercetina<br>Rutina<br>Miricetina | Brócolis, chá preto,<br>cebola, alface, maçã,<br>cerejas, uvas, vinho<br>tinto              |
| Flavonas       | C=O na<br>posição 4                                                   |   | Cricina<br>Apigenina                            | Cascas de fruta, aipo,<br>salsa                                                             |
| Antocianidinas | OH no C-3, com<br>ligações duplas<br>conjugadas, sem<br>C=O no<br>C-4 |  | Malvidina<br>Cianidina<br>Apigenidina           | Uvas roxas, vinho<br>tinto,<br>morangos, cerejas,<br>frutas e cascas de<br>frutas coloridas |

Fonte: THOMAZ, 2014.

Os flavonoides encontrados na própolis são considerados os principais compostos responsáveis pelos seus efeitos benéficos. As propriedades farmacológicas da própolis têm sido muito estudadas nesses últimos anos. Suas principais aplicações são voltadas para o desenvolvimento de produtos, utilizados como tratamentos alternativos de saúde, além de poder ser utilizada na produção de medicamentos propriamente ditos. Dentre essas propriedades se destacam suas ações: antiviral, antitumoral, antiprotzoária, hepatoprotetora, antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante e cicatrizante, sendo essas quatro últimas propriedades essenciais para o tratamento de feridas (BURDOCK, 1998; BANSKOTA, TEZUKA, KADOTA, 2001; BANKOVA, 2005; HUANG, 2014).

A Figura 3 mostra algumas estruturas de flavonoides comumente encontrados na própolis: a quercetina, miricetina e a galangina são flavonóis; a apigenina, a crisina e o canferol são exemplos de flavonas e a pinocembrina e a naringenina são flavanonas.

**Figura 3 – Alguns flavonóides encontrados na própolis.**



Fonte: HUANG, 2014.

### 3.1.5 A pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e por sua localização externa está em contato direto com o meio ambiente, sendo sua principal função proteger o organismo de possíveis agressões externas, formando, portanto, uma barreira entre os órgãos internos e o ambiente externo. A pele possui diferentes funções, como promover proteção contra microrganismos, agentes físicos e químicos; regular a temperatura corpórea pelo do ajuste do fluxo sanguíneo e da transpiração; prevenir a desidratação e fornecer suporte a vasos sanguíneos e nervos responsáveis pelas funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato) (PAUL e SHARMA, 2004). A pele é ainda o componente periférico do sistema imune, sendo capaz de iniciar uma resposta imune primária frente a um estímulo, como um patógeno. É na verdade um órgão complexo que envolve diversos tipos celulares e estruturas, e pode ser dividida em três camadas principais: epiderme, derme e

hipoderme (DEBENEDICTIS et al., 2001; MAKRANTONAKI e ZOUBOULIS, 2007; SPELLBERG, 2000).

Como já comentado, por ser rica em vasos sanguíneos, glândulas e tecido adiposo, a pele desempenha papel fundamental na termorregulação corporal (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2012). Suas camadas mais profundas possuem terminações nervosas que transmitem ao sistema nervoso central as percepções desencadeadas por estímulo do meio externo. Dentre essas sensações estão frio, calor, dor, tato e alterações de pressão (LIMA, 2010).

Histologicamente a pele é constituída por duas camadas distintas e firmemente unidas, sendo a mais superficial denominada epiderme e a mais profunda derme. Abaixo da derme uma terceira região pode ser identificada, a hipoderme, que representa um reservatório energético constituído principalmente por tecido adiposo (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005; (DALLAN, 2005; REED et al., 2011).

#### *3.1.5.1 Organização estrutural da pele*

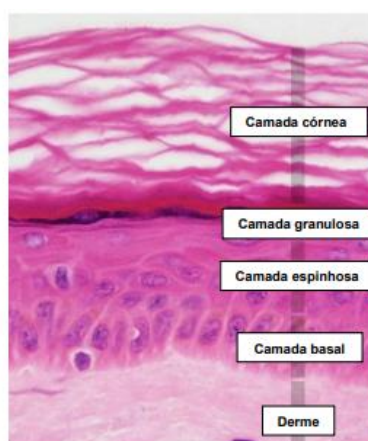
A derme representa uma camada com espessura variável de tecido conjuntivo denso. Já a epiderme é formada por um epitélio de revestimento, estratificado, pavimentoso e queratinizado (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005). O limite entre a epiderme e a derme não é regular. A derme apresenta projeções, as papilas dérmicas, que se encaixam em reentrâncias da epiderme, aumentando a coesão entre as camadas (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005) (Figura 4).

A epiderme é composta de várias camadas. O estrato córneo, camada fina e mais externa da epiderme, é composto de células desvitalizadas e queratinizadas. É seca, impermeável à água e rica na proteína protetora chamada queratina. As camadas seguintes da epiderme (estrato lúcido, estrato basal, estrato granuloso e estrato germinativo) contêm células. A epiderme é uma camada protetora que proporciona uma barreira a lesões, à contaminação e à luz. Ela também evita a desidratação dos tecidos subjacentes, retém fluidos e nutrientes dentro da pele e produz melanina, a qual é responsável pela cor da pele.

A derme é composta primariamente de tecidos conjuntivos fibrosos de colágeno e elastina. Estas fibras estão entremeadas dentro de uma matriz de polissacarídeos e proporcionam força e elasticidade a pele. Os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas estão contidos na derme. Uma rede de linfáticos, vasos sanguíneos e terminações nervosas cutâneas suprem os anexos da pele.

A derme produz pêlos, regula a temperatura do corpo, abriga receptores sensoriais, supre nutrientes, oxigênio e sintetiza várias substâncias químicas. Ela é composta por fibroblastos, colágeno, substância matricial e proteínas de elastina. Abaixo da derme há tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo. Ela proporciona isolamento, suporte e amortecimento para a pele e outros tecidos, a fim de suportar tensões e pressões, armazenando energia para a pele. Abaixo desta camada, estão localizados fásia e músculos que proporcionam amortecimento adicional por sobre as estruturas ósseas.

**Figura 4 – Corte de pele humana.**



Fonte: Adaptado de Slomianka, 2009.

#### *3.1.5.2 Lesões de pele*

Uma lesão de pele é um defeito ou rompimento da sua estrutura, e sua gravidade varia de acordo com as camadas envolvidas: lesões superficiais atingem a derme, lesões profundas superficiais atingem o tecido subcutâneo (hipoderme), e lesões profundas totais atingem os músculos e as suas estruturas adjacentes (BORGES et al., 2007).

A pele é o órgão acometido por feridas e quando lesada requer reparação. Ferida é definida como a interrupção na continuidade de um tecido, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou provocado por uma afecção clínica, que, uma vez desencadeada, ativa as defesas orgânicas para o contra-ataque. (MALAGUTTI; KAKIHARA, 2010).

Dependendo da natureza do processo de reparo da lesão, esta pode ser classificada como aguda ou crônica. As feridas agudas normalmente cicatrizam completamente, com formação

mínima de cicatrizes, dentro de 8 a 12 semanas. As causas primárias destas feridas são fatores externos como abrasões, cortes, penetração de objetos, incisões cirúrgicas, queimaduras, choques e contato com substâncias corrosivas ou radiação (BOATENG et al., 2008).

Dentre as feridas agudas, as queimaduras devem receber atenção especial, uma vez que são de difícil tratamento, podendo causar danos extensos, perda de fluidos e trauma ao paciente. O atendimento a vítimas de queimaduras, incluindo os casos complicados por outros tipos de trauma, exige pessoal com treinamento especializado e acesso a equipamentos e materiais adequados. O que configura um desafio para todos os profissionais da área da saúde e exige constante aperfeiçoamento pela equipe (IURK et al., 2010).

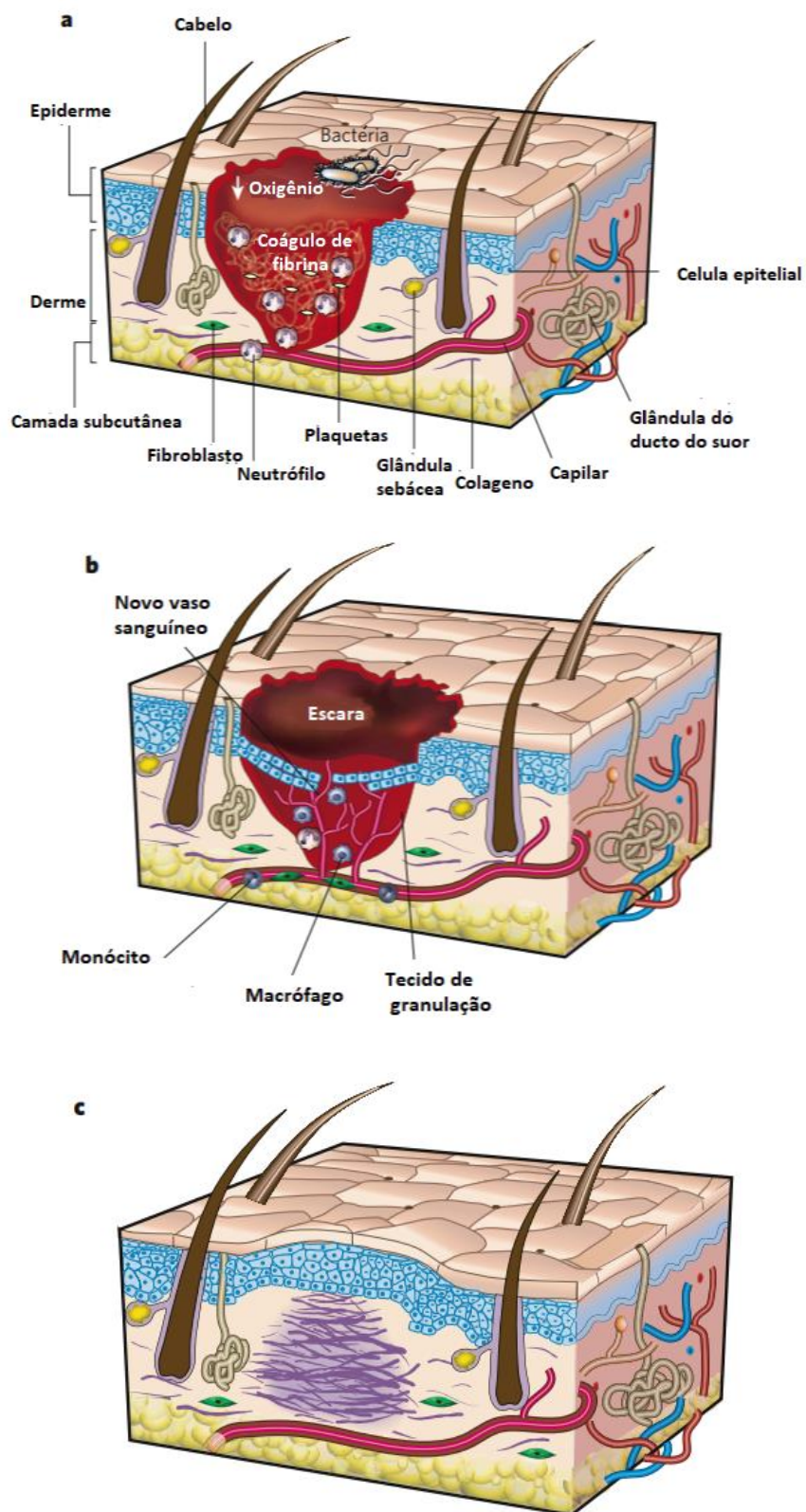
As feridas crônicas, por outro lado, cicatrizam lentamente devido a danos constantes ao tecido, ao mau tratamento da lesão ou a condições fisiológicas como diabetes, infecções persistentes, trombozes, edemas ou pressão local prolongada. Este tipo de ferida pode conter níveis elevados de substâncias que perpetuam a fase inflamatória, podendo persistir sem sinais de cicatrização por meses ou até anos. Exemplos de feridas crônicas são as úlceras de pressão e as úlceras de perna (BOATENG et al., 2008; PAUL e SHARMA, 2004; WIEGAND e HIPLER, 2010).

A cicatrização é um processo extremamente dinâmico, e envolve interações complexas entre moléculas da matriz extracelular, mediadores solúveis, várias células residentes e leucócitos infiltrados (LAU et al., 2009) e pode ser entendida como um conjunto de processos que se iniciam logo após a ocorrência de uma lesão, em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição epitelial (CAMPOS; FRANCO; GROTH, 2007).

A cicatrização é uma resposta inflamatória aguda, com edema e formação de exsudado seroso, provocando morte celular, ruptura dos vasos sanguíneos, seguidos por coagulação e alteração da vascularização (ALVES; MACHADO; NORONHA, 2011; MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011), sendo um processo complexo composto por três estágios clássicos de reparo das feridas: inflamação, granulação (proliferação celular, formação de tecido) e re-epitelização (remodelação do tecido). (Figura 6)

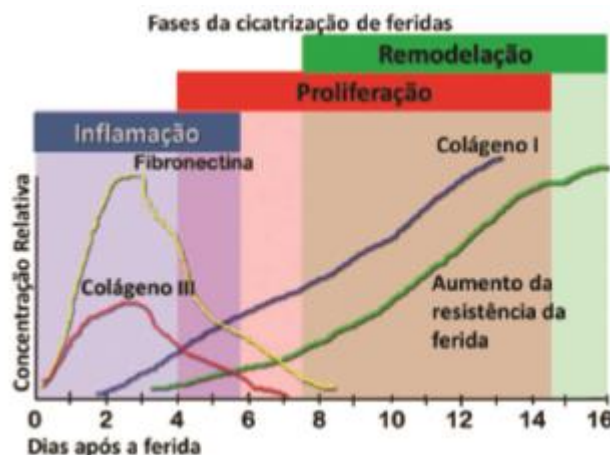
No entanto, há dinamismo e sobreposição entre essas fases, sendo impossível o estabelecimento das mesmas em períodos específicos (KUMAS et al., 2005) (Figuras5).

Figura 5 - Fases da ferida: (a) inflamação, (b) granulação e (c) repitelização.



Fonte: Gurtner et al., 2008.

**Figura 6 - Fases da cicatrização.**



Fonte: <http://saudecelulahumana.blogspot.com.br/2016/09/fibroblastos-e-seu-papel-na-regeneracao.html>. (Acessado em 19 de maio de 2018)

#### 3.1.5.2.1 Fase inflamatória

A resposta inflamatória é uma reação local não específica à lesão do tecido e/ou invasão bacteriana. Esta fase dura cerca de 48 horas depois da lesão. É uma parte importante dos mecanismos de defesa do corpo e fase essencial do processo de cicatrização. A ferida é caracterizada por um ambiente hipóxico (isquêmico), no qual um coágulo de fibrina é formada. Bactérias, neutrófilos e plaquetas são abundantes nesta fase da ferida (GURTNER et al., 2008).

A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a lesão, com vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular para a migração de neutrófilos para a ferida. Estes produzem espécies reativas de oxigênio (ERO), que auxiliam na destruição bacteriana, sendo substituídas gradativamente pelos macrófagos, fundamentais para a transição para a fase seguinte.

Esta fase tem as funções de ativar o sistema de coagulação, promover o debridamento da ferida e defesa contra microrganismos. É composta por três outras fases que ocorrem quase que simultaneamente:

1. Fase trombocítica - a hemostasia é a primeira resposta à lesão e se caracteriza pela vasoconstrição. Os trombócitos são responsáveis pela agregação plaquetária e ativação da cascata de coagulação.

2. Fase granulocítica – nesta fase, os granulócitos liberam enzimas proteolíticas mediadoras (colagenases, elastases e hidrolases ácidas); há aumento do fluxo sanguíneo (vasodilatação); perda de líquidos, proteínas e células pelos capilares (produção de exsudato); ocorre a quimiotaxia (atração de macrófagos) e a fagocitose (os neutrófilos e macrófagos digerem as bactérias e restos celulares).

3. Fase macrofágica – nesta fase, há o início da reparação, onde os macrófagos secretam proteases, fatores de crescimento e substâncias vasoativas que dão continuidade ao processo de debridamento e exercem a função de controle central das fases de cicatrização subsequentes.

#### 3.1.5.2.2 Fase proliferativa

Nesta fase, a migração de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais resultam na nova epitelização, formação de tecido de granulação e angiogênese. Este estágio ocorre em cerca de 2-10 dias após a lesão. Os fibroblastos são responsáveis pela construção da matriz extracelular com a formação de coágulos de fibrina e com os vasos sanguíneos para fornecimento de oxigênio e nutrientes para os fibroblastos, com posterior substituição da rede de fibrina com glicoproteínas (fibronectina e laminina) em proteoglicanos (ácido hialurônico) e colágeno (tipo III). (GURTNER et al., 2008).

#### 3.1.5.2.3 Fase de maturação ou remodelamento

A característica mais importante desta fase é a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente. Este estágio dura por um ano ou mais. O colágeno desorganizado é depositado pelos fibroblastos que migraram para a ferida. A ferida se contrai perto de sua superfície e a parte mais larga passa a ser a mais profunda. A ferida re-epitelizada é ligeiramente mais alta que a superfície circundante, e a região curada não contém apêndices normais da pele (GURTNER et al., 2008).

Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Estas mudanças se refletem em aumento da força tênsil da ferida. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização. Fibroblastos e leucócitos secretam colagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, havendo sucesso quando a deposição é maior. Mesmo após um ano, a ferida apresentará um

colágeno menos organizado do que o da pele sã, e a força tênsil jamais retornará a 100%, atingindo em torno de 80%, após três meses.

### 3.1.6 Tratamento de lesões de pele

O corpo humano pode sofrer lesões devido à exposição a agentes físicos, químicos ou biológicos. A variedade e incidência das lesões de pele existentes e a dificuldade de tratamento de muitas delas são um desafio para os profissionais da saúde. Assim, existe a demanda por curativos que possam acelerar a cicatrização, facilitando o tratamento e reduzindo os riscos para o paciente (WIEGAND e HIPLER, 2010), além de diminuir o tempo e os dispêndios com a internação nos casos mais graves.

Quando a perda tecidual resulta na formação da ferida, o processo de cicatrização pode não ser suficiente para garantir o desenvolvimento adequado de reparação. Nestes casos, além da limpeza e desbridamento, outro princípio importante da terapia inclui o uso de oclusão com substitutos dérmicos sintéticos (coberturas dérmicas), amaniplulação mecânica (por exemplo, consiste na aplicação de força mecânica diretamente sobre o tecido necrótico a fim de facilitar sua remoção, promovendo um meio ideal para a ação de cobertura primarias oudebridamento instrumental conservador – pode ser realizado à beira do leito ou ambulatorial, em lesões cuja área de necrose não seja muito extensa(MENDOÇA e COUTINHO NETO, 2009; MALAFAIA, 2010; GURTNER et al., 2008;BRASIL, 2013).

A existência de uma variedade de tipos de feridas, com suas fases e modos de cicatrização, levou à evolução no desenvolvimento de novos modelos de tratamento a exemplo das coberturas. Antes de 1960, as coberturas eram consideradas apenas produtos passivos que tinham o papel mínimo no processo de cicatrização, porém, em 1962, o pesquisador Winter introduziu o conceito da importância de um ambiente ideal para o processo de cicatrização de feridas e do envolvimento das coberturas na estabilização e manutenção do ambiente. Esta mudança de paradigma resultou no desenvolvimento de coberturas funcionalmente ativas, que através da interação com as feridas, recobrem, criam e mantêm a umidade no campo de cicatrização(BALBINO, 2005; VALENCIA BASTO, 2010).

Hoje no mundo há diversos tipos de coberturas que podem ser utilizados nas diferentes etapas de tratamento das feridas, das quais não podemos esquecer da higienização, desbridamento,

diminuição da comunidade bacteriana, controle do exsudato, estímulo à granulação e proteção da re-epitelização (SMANIOTTO et al., 2012).

A escolha da cobertura mais apropriada para manter o ambiente propício para a reparação tissular deve observar os seguintes princípios:

- Manter a umidade na interface da ferida/curativo- em um ambiente úmido, as células epiteliais conseguem deslizar pela superfície da lesão, e, além disso, são intensificados os processos autolíticos naturais, decompondo o tecido necrótico e também proporciona-se a redução da dor no local da ferida, porque as terminações nervosas não sofrem ressecamento.
- Permitir troca gasosa - a cobertura deverá ser permeável suficiente para permitir a entrada de oxigênio suficiente para a realização do processo de mitose e excreção de gás carbônico.
- Remover excesso de exsudato - embora a superfície da ferida deva permanecer úmida, a umidade excessiva causa maceração do tecido da pele circundante.
- Isolamento térmico - para que as células realizem mitose é necessário que o leito da ferida mantenha temperatura entre 36 °C e 37 °C. Toda vez que o leito for resfriado, ou seja quando ocorre a utilização de soluções geladas na lesão, há um retardo no processo de cicatrização desta ferida.
- Ser impermeável a bactérias - todos os curativos devem possuir alguma propriedade antibacteriana. Alguns deles têm elementos constituintes que são bactericidas, enquanto outros criam uma barreira entre a ferida e o ambiente.
- Permitir a remoção sem causar trauma - se um curativo for de fácil remoção, ele provavelmente não causará lesão aos tecidos recém-formados na ferida e tampouco será doloroso para o paciente.

Segundo Mogosanu e Grumezescu (2014), vários produtos são usados como curativos passivos, ou seja, essenciais para a manutenção da umidade ideal na estimulação de cicatrização de feridas, podendo ser citados como exemplos as gazes, hidrogéis, hidrocolóides e filmes transparentes, dentre outros.

Algumas características, descritas por Malagutti e Kakhiara (2010), são analisadas como critério de escolha do curativo ideal, tais como: custo e acessibilidade, capacidade de absorção, proteção contra contaminação, manutenção do ambiente úmido, frequência de troca, capacidade de

aliviar a dor, se são isolantes térmicos, filtro de odores, se são termolábeis, se podem se desnaturar, maleabilidade, transparência, entre outros.

Neste sentido, métodos alternativos para o fechamento de feridas foram desenvolvidos e aperfeiçoados nas últimas décadas (LAUTO et al., 2010; SLATE et al., 2018). Os métodos atuais no tratamento de feridas de difícil cura incluem desbridamento, irrigação, antibióticos, enxertos de tecidos e enzimas proteolíticas.

Os curativos modernos podem ser classificados de acordo com o tipo de contato que estabelecem com a lesão: curativos primários são aqueles usados em contato direto com o tecido lesado; curativos secundários são aqueles colocados sobre o curativo primário, curativos em ilha são os que possuem uma região central absorvente cercada por uma porção adesiva.

Uma segunda classificação comum para curativos refere-se à sua forma física: pomadas, filmes, espumas e géis (BOATENG et al., 2008). Outra classificação divide os curativos de acordo com a sua atividade: inativos (gaze e outros tecidos), interativos (hidrocolóides, hidrogéis) e ativos (que contêm em sua composição fatores de crescimento e inibidores de proteases). Apenas os curativos ativos são capazes de influenciar a cicatrização, enquanto os outros têm a função de promover um ambiente úmido, e prover isolamento térmico e proteção contra microrganismos (WIEGAND e HIPLER, 2010).

Boateng et al. (2008) também propõem a divisão dos curativos modernos em: hidrocolóides, curativos de alginato, hidrogéis, filmes adesivos ou semi-permeáveis, espumas, matrizes celulares e acelulares, e curativos biológicos.

Os curativos biológicos, por sua vez, são feitos de biopolímeros, que são polímeros de origem natural, possuindo uma variedade de benefícios ambientais, como serem derivados de fontes renováveis, biodegradáveis e biocompatíveis (BOATENG et al., 2008). Os biopolímeros são divididos em classes, como os ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos, polidienos, ligninas e poli(alfa-hidroxi-alcianoato)s (ELIAS, 2005).

Em alguns casos, os biopolímeros podem ser misturados com componentes ativos como agentes antimicrobianos e fatores de crescimento passíveis de liberação no ferimento (BOATENG et al., 2008; YUDANOVA e RESHETOV, 2006; WIEGAND e HIPLER, 2010).

Um dos grandes desafios atuais da cirurgia moderna tem sido a substituição de tecidos do organismo, inclusive em áreas de lesão cutânea, por meio do uso de implantes ou de inclusões de materiais sintéticos, de produtos artificiais ou de biomateriais (FREDEL; BARRA, 2004).

Um biomaterial é definido como uma substância, de natureza sintética ou natural, que pode ser utilizada por um período de tempo, para melhorar, aumentar ou substituir parcial ou inteiramente tecidos ou órgãos. São seus exemplos, materiais que substituem ou induzem o crescimento do tecido ósseo, cartilagens, ligamentos, peles e reparação de tecido, como a polpa dentária (FRANKE, 2003). Park (1984) define o biomaterial como substâncias sistêmicas, farmacologicamente inertes, idealizadas para implante ou incorporação por um sistema vivo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido (RATNER, et al., 2013).

A ciência dos biomateriais envolve a medicina, as ciências naturais e a engenharia, delimitando duas grandes áreas: biotecnologia ( aplicação da biologia moderna, particularmente a manipulação genética de microrganismos à medicina, química, além de outras aplicações); bioengenharia (compreende a interação entre as ciências naturais e engenharia direcionada para a medicina).

Inicialmente tinha-se por objetivo a obtenção de materiais biocompatíveis que pudessem substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente, em seguida, focou-se no desenvolvimento de materiais biodegradáveis, com capacidade de serem incorporados ou absorvidos (após dissolução) pelo tecido hospedeiro, e, mais recentemente, tem-se trabalhado com o conceito de biomimética, buscando-se materiais que participem de forma ativa no processo de recuperação, atuando no tecido de forma específica, com estimulação em nível celular (HOLZAPFEL et al, 2013).

Embora não seja possível generalizar quais devam ser as características requeridas dos biomateriais, pois estas dependem fundamentalmente de sua aplicação, alguns tipos de propriedades são frequentemente avaliados para que o projeto do dispositivo possa ser realizado de forma efetiva e economicamente atraente.

Neste sentido, destacam-se propriedades biológicas, como a biocompatibilidade, com frequência associada à hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenidade, estimulação de adesão e proliferação celular; as propriedades físicas, como morfologia da superfície, energia

superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, cor, transparência e permeabilidade, propriedades mecânicas como tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade e propriedades químicas, como densidade, estabilidade, resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo (HUBBELL, 1999).

Na área da medicina regenerativa são muito utilizados os biopolímeros, principalmente para o tratamento de feridas e a liberação controlada de fármacos, entre outras. Isto se deve às características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, semelhança com a matriz extracelular e por induzir e estimular o processo de cicatrização de feridas (BELLINI, 2012; MOGAÇANU, 2014). Sua degradação depende de processos enzimáticos e por isso há maior propensão destes materiais serem metabolizados pelo organismo humano, porém, sua taxa de degradação pode variar de paciente para paciente. Além do mais, os polímeros naturais possuem grupos funcionais (como grupamentos amino, grupos carboxílicos e hidroxilas) disponíveis para modificações químicas (hidrólise, oxidação, redução, esterificação, ligações cruzadas, etc.) e enzimáticas e, também, para interagir com outras moléculas, o que permite a obtenção de uma variedade de produtos com propriedades adaptáveis (GOMES et al, 2016).

### 3.1.7 Polímeros

Os polímeros são macromoléculas, formadas por unidades repetitivas. Estas unidades são chamadas de meros, ou monômeros, que são moléculas menores, tais como: eteno, propeno, buteno, entre outras. Normalmente o grau de polimerização, quantidade de meros, fica acima de 750 (CANEVAROLO, 2006) e o peso molecular acima de 10.000, as moléculas abaixo deste valor são consideradas oligômeros (MANO, 1999; CANEVAROLO, 2006).

Polímeros (“polymers”) são caracterizados por seu tamanho, estrutura química e interações intra- e intermolecular da cadeia. O número de meros das cadeias poliméricas é denominado grau de polimerização, sendo geralmente simbolizado por  $n$  ou DP Grau de polimerização) (MANO, 1999).

#### 3.1.6.1 Classificação dos Polímeros

Os polímeros podem ser naturais, originados de plantas e animais, como a borracha; os polissacarídeos, a celulose, ou sintéticos como os plásticos, as borrachas e as fibras. Para que se possa classificar os polímeros os métodos mais comuns são de acordo com sua estrutura química,

método de preparação, as características tecnológicas e seu comportamento mecânico (SELKE, 2009).

#### 3.1.6.1.1 Polímeros sintéticos

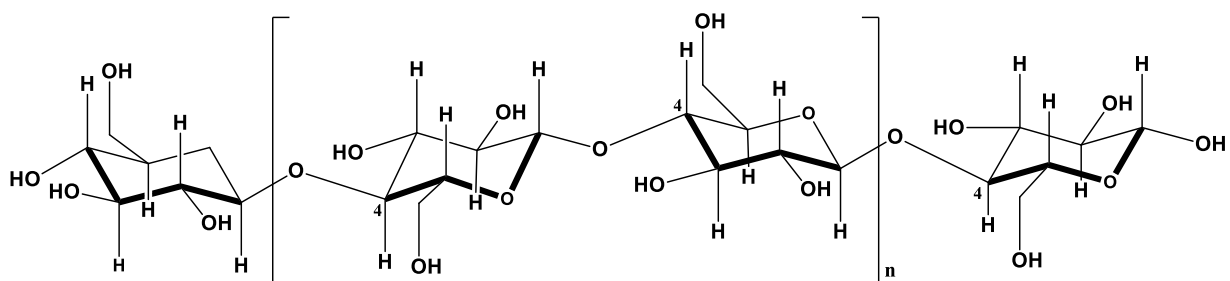
Os polímeros sintéticos são aqueles obtidos industrialmente, em geral, a partir de moléculas de baixo peso molecular, e também largamente utilizados, como, por exemplo, poli(etileno), poli(álcool vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamidas), poli(etilenoglicol), poliésteres. No caso dos poliésteres, estes são mais utilizados pelo químico e têm no poli(glicolídeo) o polímero alifático linear mais simples.

#### 3.1.6.1.2 Polímeros Naturais

A aplicação de polímeros naturais pelas indústrias de diferentes áreas como embalagens, farmacêutica, médica, alimentícia, entre outras, vem se destacando devido às diversas vantagens como a disponibilidade a partir da utilização de resíduos agrícolas ou fontes marinhas, biocompatibilidade e biodegradabilidade, tornando-os mais seguros ecologicamente (PRASHANTH & THARANATHAN, 2007). Macromoléculas naturais são extraídas a partir de diferentes fontes, onde se encontram polímeros como a quitina, amidos (batata, milho, trigo, arroz), derivados de celulose e gomas (guar, carragena, alginato e pectina), além de proteínas de origem vegetal (gelatina, caseína, colágeno, zeína, etc.) (ANITHA et al., 2014) e animal (soro de leite) (CUTTER, 2006).

#### 3.1.6.1.3 Carboximetilcelulose (CMC)

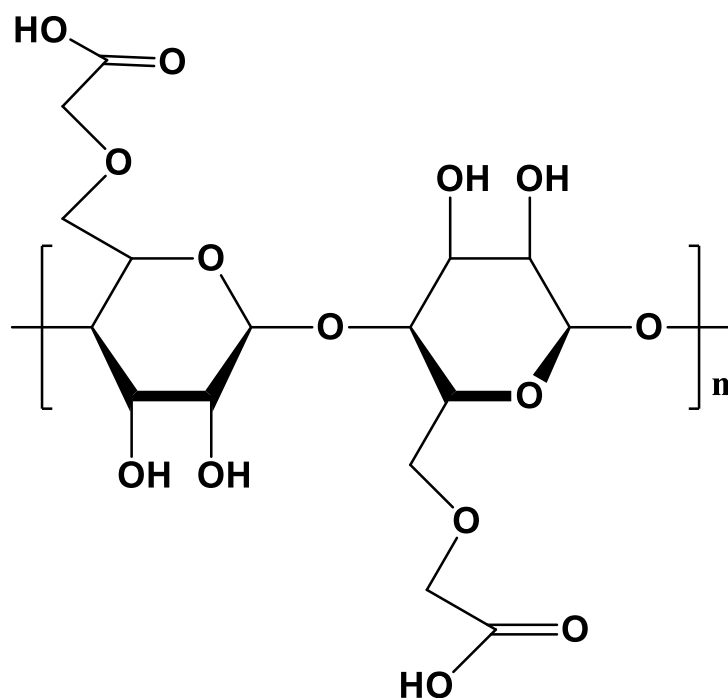
A celulose é um polímero natural, um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose. Apresenta elevada massa molecular, considerável grau de cristalinidade, insolubilidade em água e estrutura rígida. A celobiose é formada por anéis de b-D-glicopirranose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ , como mostra a Figura 7.



Fonte: AUTORA, 2018.

A estrutura rígida da celulose pode ser modificada através de reações de derivatização, isto é, da introdução de grupos funcionais na sua cadeia. A carboximetilcelulose (Figura 8) é preparada em duas etapas, a partir da reação entre a celulose e a soda cáustica formando o álcali de celulose, que em seguida reage com o ácido monocloroacético (eterificação), sob condições controladas. O polímero formado na eterificação é mais flexível, com forças intermoleculares mais fracas e cadeias menos regulares, apresentando propriedades que diferem significativamente da celulose de partida (MACHADO, 2000).

**Figura 8 - Estrutura química do CMC.**



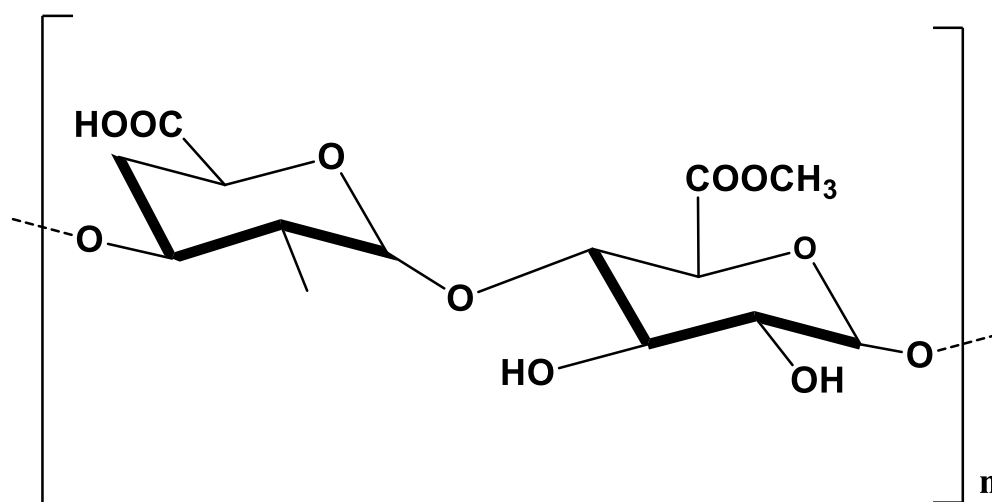
Fonte: Adaptado de Venanzi, 2008.

#### 3.1.6.1.4 Pectina

A pectina é um polímero estrutural solúvel em água, com capacidade de formar géis, encontrados nas paredes celulares dos tecidos vegetais, geralmente extraídas a partir da casca e polpa de frutas cítricas ou maçã, sementes de girassol, entre outras (BAYARRI et al., 2014; THAKUR et al., 1997). É um polímero comestível e amplamente utilizado pelas indústrias de alimentos como emulsificante, geleificante, espessante e apresenta a capacidade de interagir com proteínas em valores de pH baixos, auxiliando na estabilização de dispersões ácidas (LUO e WANG, 2014; CHEN et al., 2010; LAM et al., 2008). O seu potencial para aplicações biomédicas (suportes, liberação de fármacos, engenharia de tecidos, terapia genética) também vem sendo estudado (RIBEIRO et al., 2014; COIMBRA et al., 2011; NISHIJIMA et al., 2009).

Quimicamente a pectina é um polímero aniônico composto por uma cadeia linear de ácido galacturônico (Figura 9), parcialmente esterificado com grupos metoxila ( $-\text{COOCH}_3$ ), ligado por associação  $\alpha$  (1,4) em uma cadeia que pode conter ramificações de arabinose, galactose e xilose (NINAN et al., 2013; NUNES et al., 2012). Muitas das unidades do ácido galacturônico são esterificadas com metanol e o grupo éster pode ser facilmente removido pela ação de enzimas ou álcalis (JINDAL et al., 2013; LOOTENS et al., 2003).

**Figura 9 - Representação esquemática da estrutura primária da pectina (HAMMAN, 2010).**



Fonte: AUTORA, 2018.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do Material

As amostras de própolis vermelha foram coletadas no mês de janeiro de 2014 (Figura 10) e obtidas de coletores colocados nas caixas de abelhas *Apis mellifera*, em apiário localizado na região de manguezais do município de Marechal Deodoro-AL (S9°42'10.2924"e W35°54'21.5316").

**Figura 10 – Própolis coletada no município de Marechal Deodoro-AL.**



Fonte: AUTORA, 2018.

### 4.2 Tratamento das Amostras de Própolis Vermelha

As amostras de própolis bruta, um total de 1kg, foram acondicionadas sob refrigeração por 24 horas em recipiente ambar após prévia retirada de todos os resíduos presentes no material, como restos de plantas e/ou de abelhas. Em seguida, o material foi triturado, homogeneizado com auxílio de um moinho, pesado, acondicionado em sacos plásticos hermeticamente fechados e armazenadas em freezer a -18°C.

### 4.3 Obtenção do Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV)

Para a preparação do EEPV, foram pesados 300g da própolis vermelha triturada, obtida conforme item 4.2 e transferida para frasco de vidro ambar contendo 700 mL de álcool etílico P.A (95° GL). O processo de extração ocorreu em temperatura ambiente (28 °C), com troca do solvente de 48 em 48 horas durante uma semana.

Após o processo de maceração, o extrato passou por um processo de filtração e o filtrado, denominado de Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV), o qual foi submetido a rotaevaporação à 40°C para posterior acondicionamento em frasco de vidro âmbar hermeticamente fechado e devidamente identificados para conservação.

#### **4.4 Caracterização Química do Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV)**

##### **4.4.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A determinação do espectro no IV (com transformada de Fourier) do EEPV em estado sólido foi realizada por refletância total atenuada (RTA), na região média do infravermelho, compreendida entre 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  e número de scans de 64. Os resultados foram expressos na porcentagem de transmitância de infravermelho. O equipamento utilizado foi um ThermoScientific acoplado ao software Omnic para aquisição de dados.

##### **4.4.2 Análise dos espectros de absorção na região UV-Vis**

A obtenção dos espectros de absorção molecular dos EEPV foi realizada de acordo com Park e colaboradores (1998), com algumas modificações. Soluções etanólicas dos extratos com concentração de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foram preparadas e o espectro de absorção na região UV-Vis das amostras foi obtido a partir de varredura na faixa de 200 a 500 nm, utilizando cubeta de quartzo (capacidade = 3 mL; caminho óptico = 1 cm) e espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV Mini 1240).

##### **4.4.3 Determinação do conteúdo total de fenóis**

O conteúdo total de fenóis foi obtido de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (RFC), descrito por Cicco e colaboradores (2009), com algumas modificações. Para a realização do ensaio, a amostra de EEPV foi diluída em metanol, obtendo-se uma concentração de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Adicionou-se em tubos de 5 mL, 120  $\mu\text{L}$  da solução amostra, 180  $\mu\text{L}$  de água, 300  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% (m/v), totalizando um volume de 3 mL.

Os tubos foram postos em banho-maria a 40°C no escuro por 20 minutos. Em seguida, a mistura reacional foi colocada em uma cubeta de quartzo (capacidade = 3 mL; caminho óptico = 1 cm) e medida a absorvância a 760 nm, utilizando espectrofotômetro UV-vis (Agilent 8453). Os teores de fenóis totais (TFC) foram obtidos a partir de curva de calibração utilizando ácido gálico

(0,7 a 7,0 mgL<sup>-1</sup>) como padrão e os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico/grama de extrato seco (mg de EAG/g de extrato seco). O ácido gálico foi utilizado como padrão no presente estudo, representando os compostos fenólicos em meio básico.

#### 4.4.4 Determinação do teor de flavonóides totais

Para a determinação do teor de flavonóides totais, utilizou-se o método do cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) descrito por Woisky (1996) com algumas modificações realizadas por Ahn e colaboradores(2007). Foram adicionados 1,5 mL da solução do extrato previamente preparada (25 µgmL<sup>-1</sup>) a 1,5 mL de solução metanólica de AlCl<sub>3</sub> (2% m/v).

A solução foi homogeneizada e deixada reagir à temperatura ambiente no escuro por 1 hora. A absorvância foi medida a 420 nm. Os teores de flavonóides totais foram obtidos a partir de curva de calibração realizada com quercetina (0,5 a 20 µgmL<sup>-1</sup>), e os resultados expressos em miligrama de equivalentes de quercetina/grama de extrato seco (mg de EQ/g de extrato seco).

#### 4.4.5 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH●

O método consiste em avaliar a capacidade antioxidante sequestradora de radicais. A determinação da capacidade antioxidante do EEPV foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sales (2012), com algumas modificações. O método consistiu em preparar uma solução de DPPH● (40µgmL<sup>-1</sup>) em metanol e 2,7 mL desta solução foram misturados a 0,3 mL da solução previamente preparada do extrato (25 µgmL<sup>-1</sup>).

A avaliação da capacidade antioxidante do EEPV foi feita monitorando-se a redução do radical DPPH● (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), de coloração púrpura, a DPPH-H (difenil-picril-hidrazina) de coloração amarela, por meio da medida do decréscimo da absorvância a 516 nm por espectrofotometria.

A atividade sequestradora do radical (ASR%) foi calculada usando a seguinte equação para um tempo de 30 min.:

$$\%ASR = [(Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle}] \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde, Abs<sub>controle</sub> é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH● e Abs<sub>amostra</sub> é a absorvância da mistura reacional (DPPH● + amostra).

#### 4.4.6 Determinação da capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)

A determinação da atividade antioxidante por meio da redução de ferro (FRAP) foi realizada pelo método de Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. O método baseou-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzirem em meio ácido (pH = 3,6), o complexo de Fe(III)/TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina)  $[\text{Fe(III)(TPTZ)}_2]^{3+}$ , para formar o complexo de Fe(II)  $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{2+}$ , de coloração azul, com absorção máxima em 595 nm (BENZIE & STRAIN, 1996).

O reagente FRAP foi preparado somente no momento da análise, através da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mmol L<sup>-1</sup>, pH 3,6), 2,5 mL solução TPTZ (10mmol L<sup>-1</sup> em HCl 40 mmol L<sup>-1</sup>) e 2,5 mL da solução de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (20mmol L<sup>-1</sup>). Adicionou-se 90µL de cada solução dos extratos (25 µgmL<sup>-1</sup>), em cada tubo de ensaio, acrescentou-se 270 µL do solvente e misturou-se com 2,7 mL do reagente FRAP. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos (vórtex, AP-56) e postos em banho-maria a 37 °C por 30 min. Realizou-se então a leitura da absorvância a 595 nm em espectrofotômetro UV-vis (Agilent 8453). Utilizou-se trolox para construção da curva padrão, alíquotas de 90 µL foram retiradas das soluções preparadas na faixa de 0,04 a 7,50 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de trolox/g de extrato seco.

#### 4.4.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa

A identificação e quantificação dos constituintes químicos contidos no EEPV foram realizadas a partir da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) modelo Shimadzu.

A separação dos flavonoides ocorreu utilizando uma coluna de fase reversa (C18, 150 x 4,6 mm; 5 µm), uma fase móvel que consistiu de solvente A (deionizada) e o solvente B (acetonitrila), com fluxo de 0,3 mL / min. O gradiente de eluição inicial consistiu de água (70%) e acetonitrila (30%), com uma variação da percentagem de acetonitrila a 100% em 40 min seguido de uma condição isocrática com acetonitrila (100%) até 53 minutos e retorno à condição inicial a 54 min, seguido por condições de acetonitrila isocrático (30%) até 60 min.

Padrões analíticos foram pesados (2,0 mg), transferidos para balões volumétricos de 100mL a fim de se obter uma concentração de 200 µgmL<sup>-1</sup>. As soluções de trabalho foram diluídas para se obter as concentrações finais da curva de calibração, 7,50, 5,00, 2,50, 1,00, 0,50 e 0,15 µgmL<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>.Estas curvas de calibração foram utilizados para determinar o conteúdo (ensaio) de flavonoides no EEPV.A identificação dos flavonoides foifeita pela comparação dos espectros noUV, obtidos através do detector de arranjo de fotodiodos e dos tempos de retenção obtidos para os padrões e para as amostras.

A partir da solução estoque (9 mgmL<sup>-1</sup> do EEPV), diluiu-se para balões de 5mL afim de obter concentrações de 400 ug/mL<sup>-1</sup>. Esta solução foi filtrada através de um filtro millipore de 0,22µm e em seguida injetada(2 uL da amostra)no HPLC, para a identificação de flavonoides no EEPV.

## **4.5 Preparo das Membranas**

O planejamento da parte experimental deste estudo consistiu de duas etapas. Primeira foi dedicada à produção dos géis e das membranas. A segunda, à caracterização química, física e biológica das membranas.

### **4.5.1 Produção das membranas**

Para obtenção das membranas foram produzidos géis dos polímeros pectina e carboximetilcelulose sódica (NaCMC). Os géis e as membranas foram produzidos no Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (LABTCOM), da Escolas de Enfermagem e Farmácia (ESEN FAR/UFAL).

#### ***4.5.1.1 Produção dos géis***

##### **4.5.1.1.1 Produção de Gel de Pectina**

A obtenção do gel de pectina foi realizada por meio da diluição de pectina em água destilada e a mistura foi mantida em agitação mecânica (1000 rpm) por 3 horas. Posteriormente, o gel foi filtrado a vácuo.

Os géis foram colocados em banho de ultrassom, mantidos á temperatura de 30 °C por uma hora e armazenados a 4°C, para posterior utilização.

##### **4.5.1.1.2 Produção de gel de carboximetilcelulose**

A obtenção do gel de carboximetilcelulose foi realizada por meio de dissolução de carboximetilcelulose em água destilada. A mistura foi mantida em agitação mecânica (500 rpm)

por 24 horas. Posteriormente, o gel foi colocado em banho de ultrassom, com temperatura de 30 °C por uma hora e armazenados a 4°C, também para posterior utilização.

#### 4.5.1.1.3 Preparação da mistura (membrana)

Assoluções de pectina e NaCMC foram misturadas para a preparação das membranas. Em seguida manteve-se o sistema NaCMC/Pectina/H<sub>2</sub>O sob agitação mecânica (500rpm) por 3 horas, à temperatura ambiente, para garantir a total dispersão dos géis.

Após a completa dispersão dos géis, foram acrescentados o percentual de 10% de EEPV em relação à massa total, o qual foi previamente solubilizado em propilenoglicol. Ao final, foram adicionados à dispersão, sorbitol, como agente plastificante e o benzoato de sódio, como agente conservante.

As membranas foram produzidas por solubilização, sendo a dispersão vertida em placa de vidro para permitir a evaporação do solvente em estufa a 37°C por 24 horas. As quantidades exatas dos componentes da formulação utilizadas para a preparação das membranas são descritas na Tabela 3.

**Tabela 4- Relação dos componentes das membranas poliméricas de EEPV.**

| Componentes       | Mistura (%) |
|-------------------|-------------|
| NaCMC             | 20          |
| Pectina           | 15          |
| Sorbitol          | 14,5        |
| Propilenoglicol   | 40          |
| Benzoato de sódio | 0,5         |
| EEPV              | 10          |

Fonte: AUTORA, 2018.

## **4.6 Caracterização das Membranas Produzidas**

A caracterização das membranas produzidas foi realizada no Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (LABTCON) da Universidade Federal de Alagoas, para a avaliação do

seu desempenho quanto à tensão de molhabilidade e ângulo de contato, grau de retenção de soluto, estimativa do raio médio dos poros, espessura, permeabilidade da água e de soluções aquosas.

As membranas foram caracterizadas de acordo com os procedimentos descritos a seguir.

#### 4.6.1 Análise macroscópica

A análise macroscópica foi realizada de forma subjetiva visando a observar nas membranas aspectos visuais, como cor, uniformidade (partículas dispersas homogeneamente pela membrana), transparência, presença ou ausência de bolhas e rachaduras, aspecto quebradiço, flexibilidade e facilidade de se desprender do suporte. Para comparação foram usados os seguintes parâmetros: 0– ausência; X-pouco; XX- médio; XXX- intenso.

#### 4.6.2 Aspecto das membranas

A morfologia das membranas foi avaliada macroscopicamente (utilizando uma câmera fotográfica modelo DMC-F2, Panasonic) e através da Microscopia Eletrônica de Varredura.

##### 4.6.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização através do microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia da Coordenação de Química do Instituto Federal de Alagoas. Para tanto, uma pequena quantidade das membranas foi fixada com fita metálica adesiva de carbono de dupla face e montada sobre o *stubs* do microscópio com altura de 1,0 cm de altura e diâmetro de 1,0 cm. Este material foi transferido para um metalizador QUORUM Q150R ES para ser recoberto com uma camada de ouro. Foi aplicada uma corrente de 45 mA por 200 s. O material foi analisado em MEV modelo TESCAN VEGA3 com distância de trabalho de 15,97 mm e com aceleração de voltagem igual a 20 kV.

#### 4.6.3 Espessura das membranas

A espessura das membranas foi medida com auxílio de micrômetro digital (Mitutoya, modelo MDC-25S, Japão), através de medições em sete diferentes pontos ao longo da extensão da membrana. Antes das medidas, as membranas foram previamente acondicionadas em umidade relativa de 20% por, no mínimo, 48 horas. A armazenagem prévia em umidade controlada é importante para evitar variações nos resultados, tendo sido escolhido um baixo valor de umidade relativa (20%) de modo a evitar que as amostras ficassem excessivamente ressecadas.

#### 4.6.4 Umidade

A porcentagem de umidade das membranas foi determinada pelo método gravimétrico, e foi feito em triplicata. Realizou-se a pesagem da massa inicial das membranas ( $M_i$ ), que foram acondicionadas por 24 horas em uma estufa com circulação forçada de ar a 105°C, quando foi medida a massa final ( $M_f$ ) para determinação da porcentagem de umidade (CAMPOS et al., 2005). A porcentagem de umidade foi calculada de acordo com a Equação (2):

$$\%U = [(m_f - m_i)/m_i] \times 100\% \quad (\text{equação 2})$$

Sendo:

$\%U$  = porcentagem de umidade;

$m_i$  = massa inicial da amostra (g);

$m_f$  = massa final da amostra (g).

#### 4.6.5 Grau de Intumescimento

O comportamento hídrico foi determinado através do grau de intumescimento paulatino das membranas secas. As membranas preparadas foram cortadas em círculo com diâmetro de 2cm, secas em dessecador por 24 horas e pesadas ( $W_d$ ). Após tal procedimento, foram imersas em solução tampão fosfato (PBS), em valor de pH 7,4 a 37 °C, durante 72 horas, quando foram pesadas novamente ( $W_s$ ).

A porcentagem de intumescimento ( $\% S$ ) da amostra foi obtida através da Equação (3) e calculada pela média de três repetições (BASKAR; KUMAR, 2009; QU et al., 2000).

$$\%S = [(W_s - W_d)/W_d] \times 100\% \quad (\text{equação 3})$$

Onde:

$W_s$  = massa da amostra inchada (g);  $W_d$  = massa da amostra seca (g).

#### 4.6.6 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As membranas produzidas foram analisadas por espectroscopia no infravermelho (infravermelho com transformada de Fourier - FTIR). As membranas produzidas foram analisadas para identificar as possíveis interações entre os componentes da formulação e o EEPV, comparando-se os resultados da análise de FTIR do EEPV e das membrana produzidas.

Os espectros de absorção na região de comprimento de onda do infravermelho foram registrados com um espectrômetro Thermo Scientific, modelo Nicolet iS50 FT-IR, acoplado com um acessório de reflexão total atenuada (ATR), modelo Gladi ATR, Pike Technologies, do Laboratório de Nanotecnologia da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas. As análises foram realizadas com um cristal de diamante. Foram realizadas 50 varreduras de interferogramas, proporcionando uma resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ . A análise começou com a aquisição de um espectro de fundo com o acessório ATR na posição correta no compartimento de amostra. Os espectros obtidos foram corrigidos pela subtração automática do espectro de fundo e registrados no intervalo entre  $4.000\text{ cm}^{-1}$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.6.7 Determinação da eficiência de incorporação de EEPV nas membranas

Para determinar a eficiência de incorporação do EEPV nas membranas foi determinado o teor de fenóis totais das membranas. Essas foram pesadas, colocadas em balão volumétrico de 25 mL e adicionadas a uma mistura de água destilada e etanol absoluto (99°GL). Após esse procedimento, foram levadas ao aparelho ultrassom (Unique USC 750) até que fossem completamente solubilizadas. A partir da solução estoque, foi retirada uma alíquota para um balão de 5 mL, a fim de se obter a concentração total de  $110\text{ }\mu\text{g/mL}^{-1}$ . Em seguida, foram adicionados 3,5mL de água destilada, 400  $\mu\text{L}$  de RFC e 600  $\mu\text{L}$  de uma solução de carbonato de sódio a 5%.

A determinação do fenóis totais foi realizada conforme método descrito no item 4.4.3 e para a determinação da eficiência de incorporação (Ef) foi calculada segundo Equação 4, em que o  $FT_{ini}$  é a massa equivalente de fenóis totais no EEPV adicionado à mistura ou presente inicialmente em solução e  $FT_{inc}$  refere-se à massa de fenóis totais efetivamente incorporada à membrana:

$$Ef = (FT_{inc}/FT_{inc}) \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

#### 4.6.8 Cinética de liberação de EEPV incorporado nas membranas

A cinética de liberação de agentes ativos contidos em membranas pode ser analisada através da determinação de sua concentração em um meio líquido extrator de composição apropriada. O tampão PBS é bastante utilizado para esta finalidade por possuir pH igual a 7,4, simulando condições fisiológicas, como por exemplo, no caso de uma ruptura da pele.

Com o intuito de se determinar o perfil de liberação dos componentes do EEPV, foram realizados testes de liberação *in vitro* para a membrana. Para a realização deste ensaio, amostras

de massas e diâmetros conhecidos (2cm) contendo EEPV, foram previamente pesados e colocados em béqueres com 50 mL de solução tampão fosfato salina (pH= 7,4). Os béqueres foram mantidos em estufa com temperatura de aproximadamente 37°C. Em seguida, 500µL foram retirados da solução em períodos de 1, 6, 24 e 48 horas, e, a partir dessas, foram realizadas as quantificações de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, a fim de se monitorar a liberação de fenóis ocorrida em determinado tempo.

Este procedimento foi realizado em triplicata para as membranas obtidas, a partir das formulações finais. No final dos ensaios, a quantidade de fenóis totais liberados em cada amostra recolhida foi determinada, por espectrofotometria no UV-visível, conforme método descrito no item 4.4.3.

#### 4.6.9 Teste de molhabilidade

As medidas do ângulo de contato foi realizada utilizando o goniômetro Attension Theta Optical Tensiometer que fica localizado no Laboratório de Fluidos Complexos do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas. Este equipamento analisa o formato da gota líquida quando depositada sobre um substrato sólido. É formado por uma câmera de vídeo alinhada a uma base mecânica ajustável, um dispositivo para armazenamento uma seringa micrométrica para ejeção do líquido sobre um substrato e uma fonte de luz LED. A luz é posicionada de frente para a câmera para obter contraste com o líquido usado, uma vez que o líquido era incolor. A altura do porta amostra foi determinada de tal forma que a gota não sofresse deformação após colisão com a superfície da amostra. A câmera capta a imagem da gota e, através software OneAttension, é feito a medição do ângulo de contato através dos frames, gravados em intervalo de 30ms. Todos os cuidados são tomados para evitar erros na obtenção das imagens e proceder medidas confiáveis.

O ângulo de contato foi estimado usando o método de gota séssil que se baseia nas medidas do diâmetro da base da gota e da altura.

Cada amostra teve seu ângulo de contato estático estimado após gotejamento. O fluido utilizado nesse trabalho foi o água destilada.

### 4.7 Ensaios Biológicos

#### 4.7.1 Ensaios de potencial antialérgico

##### 4.7.1.1 Preparação das células

As células RBL-2H3 (BARSUMIAN *et al.*, 1981) foram crescidas em frascos de cultura de células, com capacidade para 250 mL, em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). As células aderidas em monocamadas foram coletadas 3 dias após a repicagem, lavadas com PBS (0,2 g KCl, 8 g de NaCl, 1,15 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 0,2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 1 L) e tratadas com tripsina-EDTA 0,05%, sendo incubadas durante 5 min, a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, foram centrifugadas e ressuspensas em 1 mL de DMEM. Após contagem, as células na suspensão de  $5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  foram sensibilizadas pela adição de anti-DNP-IgE ( $1,91 \text{ mgmL}^{-1}$ ) com um excesso de 5 vezes em relação à concentração de receptores FcεRI. Então, 100 µL da suspensão de células foram colocados em uma placa de cultura com 96 poços e incubadas durante a noite a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ .

##### 4.7.1.2 Ensaio de potencial alérgico com emprego de biossensor baseado em mastócitos (ensaio direto)

As células RBL sensibilizadas pela IgE e aderidas em microplacas de 96 poços, com 70% de confluência, foram lavadas em tampão de Tyrode pH 7,4, a temperatura ambiente, e incubadas após a adição de 100 µL de DMSO e 100 µL da solução das membranas, nas concentrações de 2 a 300 µg/mL, por 20 min a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Em seguida, foram estimuladas por 100 µL do antígeno DNP-BSA (concentração final de  $0,2 \text{ µgmL}^{-1}$ , em tampão de Tyrode pH 7,4) e incubadas por 60 min a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, a placa de cultura foi deixada em banho de gelo por 10 min a fim de parar a reação de desgranulação, sendo, então, tratadas com 100 µL do substrato MUG (concentração final de  $1,2 \text{ mmolL}^{-1}$ ) para β-hexosaminidase (β-hex), seguida de incubação por 30 min, a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$ .

##### 4.7.1.3 Ensaio padrão

Para o ensaio padrão, as células foram sensibilizadas como descrito para o ensaio direto. Em seguida, foram tratadas com 150 µL da membrana de própolis vermelha nas concentrações de 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 e 300 µg, sendo estimuladas pela adição de 150 µL do antígeno nas mesmas concentrações e condições descritas no item anterior (4.7.1.2). A reação de desgranulação foi parada em banho de gelo por 10 min. Em seguida, 25 µL de solução de cada poço foram

transferidos para uma nova placa de cultura, contendo 100 µL de MUG (concentração final de 1,2 mmolL<sup>-1</sup>) preparados em tampão acetato pH 4,4. Por fim, foram adicionados 175 µL de tampão carbonato, pH 10,0, para cessar a reação.

#### 4.7.1.4 Quantificação da $\beta$ -hexosaminidase

O perfil de inibição da desgranulação foi feito pela quantificação da enzima  $\beta$ -hex liberada pelas células. A liberação espontânea das células foi medida para eliminar componentes não-específicos da desgranulação, sendo determinada em tampão de Tyrode pH 7,4. A liberação total da  $\beta$ -hex (100%) foi determinada para as células contendo 0,1% de Triton X-100. Para eliminar as interferências causadas pela fluorescência do tampão de Tyrode, a reação enzimática foi realizada na presença do mesmo. A atividade de  $\beta$ -hex no sobrenadante foi quantificada por fluorescência em um leitor para microplacas (Synergy<sup>TM</sup> HT - Biotek) com  $\lambda_{exc}$  e  $\lambda_{em}$  iguais a 360 e 450 nm, respectivamente. A  $\beta$ -hex liberada foi expressa como uma porcentagem da  $\beta$ -hex total determinada pelas células destruídas com Triton X-100 (Equação 5). Os valores de CI<sub>50</sub> foram determinados, graficamente, a partir de curvas de % de  $\beta$ -hex *versus* concentração de própolis nas biomembranas.

**(S) Amostra:** DNP-BSA (+), amostra teste (+) ou (-), células (+).

**(N) Normal:** DNP-BSA (-), amostra teste (-), células (-).

**(T) Total:** DNP-BSA (-), amostra teste (-), Triton X-100 (+), células (+).

$$\% \beta - Hex = \left( \frac{S - N}{T - N} \right) \cdot 100 \quad (\text{equação 1})$$

#### 4.7.1.5 Inibição da atividade enzimática da $\beta$ -hexosaminidase

A suspensão celular na concentração de 1 x 10<sup>6</sup> célmL<sup>-1</sup> foi centrifugada, ressuspensa em 3 mL de tampão Tyrode e adicionada a 30 µL de Triton X-100 (0,1%), para lise celular, e consequente liberação da enzima. A solução foi homogeneizada, centrifugada e o sobrenadante foi diluído para 5 x 10<sup>5</sup> célmL<sup>-1</sup> em um volume final de 3 mL de Tyrode. A solução enzimática (4,5 µL) e as soluções diluídas das amostras teste (5 µL) foram transferidas para uma placa de 96 poços e incubadas a 37°C, por 30 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL da solução de substrato fluorogênico MUG (concentração final de 1,2 mmolL<sup>-1</sup> em tampão acetato pH 4,4), sendo incubadas novamente a 37°C por mais 60 min. A reação foi finalizada pela adição de 200 µL de

uma solução tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ,  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ , pH 10,0. A fluorescência foi medida usando um leitor para microplacas com  $\lambda_{\text{exc}}$  igual a 360 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  igual a 450 nm.

#### 4.7.1.6 Viabilidade celular

Duzentos  $\mu\text{L}$  de células RBL-2H3, na suspensão de  $1,5 \times 10^5 \text{ célmL}^{-1}$  foram cultivadas em placa de cultura de células com 96 poços, e incubadas por toda a noite a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após este período, o meio foi removido e as células lavadas com 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Nos poços destinados ao branco (meio de cultura sem células) e ao controle (meio de cultura com células), adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de DMEM, e nos demais poços foram acrescentados 1000  $\mu\text{L}$  das diluições das membranas preparadas em DMEM nas concentrações de 2 a 300  $\mu\text{g/mL}$ . Uma nova incubação foi realizada, por 2 h, a  $37^\circ\text{C}$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e 200  $\mu\text{L}$  de DMEM foram adicionados juntamente com 5  $\mu\text{L}$  do corante resazurina, diluída 10 vezes a partir de uma solução estoque de 10  $\text{mg/mL}$  em PBS. A placa foi incubada por mais 3 h, a  $37^\circ\text{C}$  e 5 % de  $\text{CO}_2$ , e a fluorescência foi monitorada usando um leitor para microplacas ( $\lambda_{\text{exc}}$  igual a 530 nm e  $\lambda_{\text{em}}$  igual a 590 nm). A porcentagem de células viáveis em cada suspensão foi determinada pela Equação 06.

$$\% \text{ viabilidade celular} = \left( \frac{S - B}{C - B} \right) \times 100 \quad (\text{equação 2})$$

**S:Amostra:** célula (+), Resazurina (+), substância teste (+).

**B:Branco:** célula (-), Resazurina (+).

**C:Controle:** célula (+), Resazurina (+).

#### 4.7.2 Determinação da atividade cicatrizante in vitro

##### 4.7.2.1 Cultivo celular

Fibroblastos da linhagem 3T3 (fibroblastos embrionários de camundongos) foram semeados em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de SBF, L-glutamina (2  $\mu\text{M}$ ) e gentamicina (40  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ), e foram mantidos em estufa à  $37^\circ\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ .

##### 4.7.2.2 Ensaio de Migração Horizontal

O efeito das amostras sobre a atividade migratória dos fibroblastos foi avaliado, utilizando-se o ensaio de migração horizontal (*scratch-wound healing assay*). As células ( $7 \times 10^4 \text{ cél/poço}$ )

foram semeadas em placas de 48 poços e mantidas em estufa por cerca de 18 h para a adesão celular e formação de uma monocamada. Após a confluência 90%, foi realizado um risco linear (área livre de células) na monocamada de células utilizando uma ponteira de 200 µL. Em seguida, o meio de cultivo foi substituído para remoção das células em suspensão. As células aderidas foram expostas ao tratamento por 24 h com as amostras (5, 10 e 50 µg/ml), meio de cultura DMEM ou ao TGF-β (10 ngmL<sup>-1</sup>) (controle experimental). Após este tempo, as células foram fotografadas usando um sistema de aquisição de imagem acoplado ao microscópio invertido (Olympus IX51). As fotomicrografias foram analisadas, utilizando o software Adobe Photoshop CS5.1 para determinar a área ocupada por células após 24 h de tratamento. O fechamento da área livre de células caracterizou o índice de migração celular que foi obtido mediante o seguinte cálculo:

$$\text{Índice de migração (\%)} = \left[ \frac{A_0 - A_t}{A_0} \right] \times 100 \quad (\text{equação 7})$$

Onde A<sub>0</sub> refere-se a área original e A<sub>t</sub> a área no tempo de 24h após o risco.

#### 4.8 Análise dos Resultados

O software Statistica 7® foi utilizado para analisar os resultados numéricos referentes às propriedades das membranas, empregando-se o teste de comparação de médias de Tukey com nível de significância de 5%.

Todos os resultados são expressos como a média das medidas experimentais.

Cada valor médio é acompanhado de seu respectivo erro padrão, o que é indicado para realizar comparações entre médias de diferentes populações (PAES, 2008).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Coleta e Tratamento do Material

As amostras de própolis das abelhas *Apis mellifera* foram obtidas de coletores localizados no município de Marechal Deodoro-AL, com coordenadas geográficas S9°42'10.2924"e W35°54'21.5316". A coleta foi feita no mês de janeiro do ano de 2014 (Figura11). As própolis obtidas nos coletores foram reunidas para constituir uma única amostra. A coleta foi realizada raspando-se as própolis nas fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colmeia, bem como nas paredes das caixas (Figura 11). Após a raspagem, o material coletado foi acondicionado em saco plástico devidamente etiquetado e armazenado em freezer (-8°C) até o momento da sua utilização. Antes do processo de extração, as amostras foram examinadas criteriosamente para a retirada de eventuais impurezas.

**Figura 11– Coleta da própolis nas caixas de abelha.**



Fonte: AUTORA, 2018.

A Tabela 4apresenta os valores médios para o teor de cinzas, umidade, sólidos solúveis e cera para todas as amostras de própolis analisadas, de acordo com as regiões de coleta.

**Tabela 5 - Identificação de qualidade da própolis (n=3).**

| Sólidos       | Umidade      | Cinzas      | Ceras         |
|---------------|--------------|-------------|---------------|
| média% ± DP   | média% ± DP  | média% ± DP | média% ± DP   |
| 68,93 ± 0,611 | 6,68 ± 0,562 | 0,02± 0,01  | 24,36 ± 0,032 |

Fonte: AUTORA, 2018.

Segundo o Ministério da Agricultura – MAPA (BRASIL, 2002) são aceitáveis valores no mínimo 35% para o teor de sólidos. Os resultados para sólidos solúveis em etanol estão de acordo com a legislação, visto que a amostra apresentou valor de 68,93% (BRASIL, 2002). Estes parâmetros de sólidos solúveis estão altamente relacionados ao solvente utilizado e a solubilidade da amostra no mesmo (FUNARI et al., 2006).

Teores de sólidos no extrato etanólico de própolis também foram encontrados por Ferro e Funari (2006), em amostras analisadas de própolis obtendo os seguintes valores 54,82%, 54,41% e 51,96%, mostrando-se está adequado com a legislação Brasileira e inferior aos valores obtidos no nosso estudo.

A umidade da própolis pode acarretar desenvolvimento de fungos e mofo, gerando fermentações indesejáveis e tornando o material impróprio para o comércio além de gerar toxinas prejudiciais à saúde (GARCÍA et al., 2010; MARCUCCI, 2008). A manipulação excessiva resulta em valores elevados de umidade pelo contato prolongado com o ambiente externo (MELO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012).

Funari e Ferro (2006) obtiveram valores de perdas por dessecação entre 10,89 a 11,05%. Lima (2009), entre períodos secos e chuvosos, encontrou valores de umidade entre 4,73% a 6,18%. Melo; Matsuda e AlmeidaMuradian (2012), por sua vez, relataram os valores entre 2,26% e 9,89% para as amostras analisadas.

Nesta pesquisa, o valor encontrado de umidade foi 6,68% (Tabela 4), que é considerado satisfatório, visto que está de acordo com os requisitos em legislação que preconizam para umidade teores abaixo de 8% (BRASIL, 2001), o que garante a qualidade da própolis bruta, devendo ser também um parâmetro obrigatório.

Observou-se que na amostra de própolis estudada, o teor de cinzas foi de 0,2%, mostrando ser a que resultou menor quantidade de resíduos inorgânicos. Assim, os resultados (Tabela 4) comprovam que a amostra está de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2002), que preconiza uma variação em torno de 1% para cinzas. Esta determinação é importante podendo detectar adulterações no produto, principalmente nos que são comercializados em pó, onde a adição de elementos como terra, por exemplo, resultaria em valores elevados de cinzas (WOYISKI, 1996). GARCIA e colaboradores (1999/2000), analisando a própolis do Paraná, encontrou valores para cinzas de 3,56%, valor este superior a todos as amostras analisadas neste trabalho.

Quanto ao teor de ceras, a amostra de própolis apresentou um teor de 24,36% de cera, considerado inferior ao máximo permitido pela legislação vigente (BRASIL, 2002) que é de 25%. Lima (2012) afirma em sua pesquisa que a sazonalidade influencia na quantidade de cera presente nas própolis, de forma que variações de  $\pm 7,61\%$  foram observadas entre períodos chuvosos e secos. Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) relataram valores médios de ceras para região Nordeste de 2,09% a 12,43%, abaixo dos valores encontrados nessa pesquisa. As abelhas podem incorporar mais cera à própolis durante períodos em que as resinas são escassas ou de difícil coleta, principalmente, durante o período de seca.

Garcia et al (2001) encontraram altos teores de cera analisando a própolis do Paraná, que corresponderam à colheita no verão 26,72% e no inverno 25,08%, semelhante aos encontrados nessa pesquisa. A faixa normalmente encontrada para o teor de ceras é na faixa de 10 a 35% (FRANCO; BRUSCHI; BUENO, 2000; VANHAELEN E VANHAELEN-FASTRÉ, 1979). O teor de ceras na própolis é necessário como controle de qualidade obrigatório, em função da possibilidade da diminuição do teor de substâncias ativas (BRUSCHI, 2002).

Com base nos dados obtidos na identificação da própolis bruta, observa-se que os valores dos parâmetros obtidos para identificação de qualidade da própolis considerando a metodologia utilizada, são permitidos para produção de produtos farmacêuticos (BASTOS et al., 2007).

## **5.2 Extrato Etanólico de Própolis Vermelha (EEPV)**

O extrato etanólico de própolis obtido apresentou uma coloração vermelha, corroborando com as variações de cores de própolis encontradas na região dos manguesais de Marechal Deodoro – AL (Figura 12).

**Figura 12– Extrato Etanólico de Própolis Vermelha.**



Fonte: AUTORA, 2018.

Neste estudo, a preparação do extrato etanólico teve rendimento em massa seca de própolis vermelha igual a 12,52%. Este valor foi obtido por extração com posterior secagem para eliminação do solvente e apresentou valor superior ao preconizado pelo Ministério da Agricultura que é de no mínimo 11% de extrato seco (BRASIL, 2001).

Cabral e colaboradores (2009), em estudo realizado com própolis vermelha, indicaram variações de rendimentos em extratos fracionados, em que foram obtidos na fração hexânica e fração clorofômica, rendimentos de 11,36 % e 30,08%, respectivamente.

Quando avaliados os extratos obtidos com etanol absoluto, esse rendimento encontra-se dentro dos valores obtidos pela técnica e na média dos valores encontrados na literatura, que foram entre 9,42% e 43,5% (BITTENCOURT et al., 2014).

**Tabela 6- Rendimento do extrato etanólico da própolis vermelha.**

| Extrato           | Massa fresca (g) | Extrato obtido (g) | Rendimento (%) |
|-------------------|------------------|--------------------|----------------|
| Própolis vermelha | 300              | 37,56              | 12,52          |

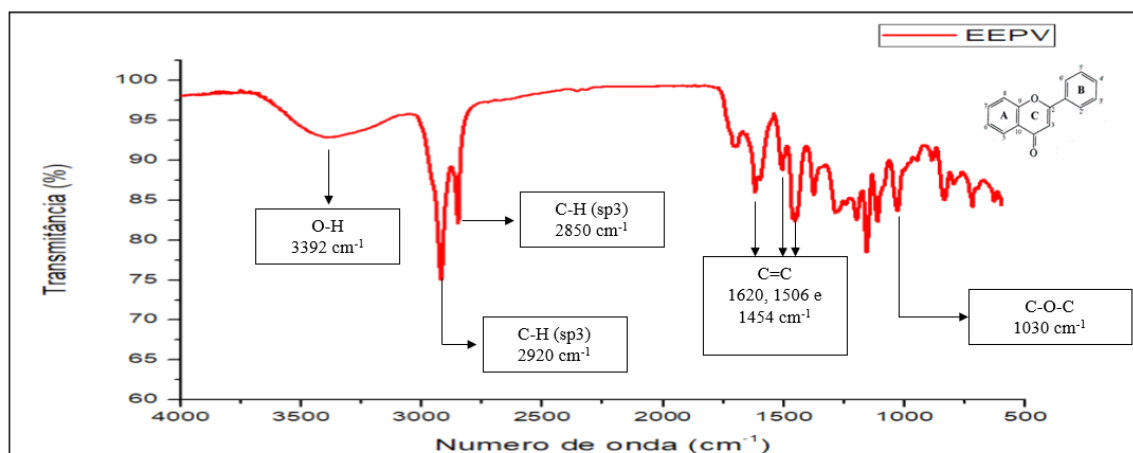
Fonte: AUTORA, 2018.

### 5.3 Caracterização Química do Extrato Etanólico da Própolis Vermelha (EEPV)

#### 5.3.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Ao realizar a análise dos espectros de IR, concentrou-se na busca de grupos funcionais que correspondem a compostos fenólicos, uma vez que a atividade biológica e funcional do extrato de própolis vermelha é atribuída a eles. Na Figura 13, os espectro do EEPV obtido no laboratório.

**Figura 13 - Espectros de FTIR para o extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV).**



Fonte: AUTORA, 2018.

O espectro ATR-FTIR do extrato de própolis mostrou estiramento característico de hidrogênio em grupo hidroxila (O-H), típicos de compostos fenólicos a  $3392\text{ cm}^{-1}$ . Também pode-se observar em  $1620$ ,  $1506$  e  $1454\text{ cm}^{-1}$  bandas correspondentes aos estiramentos  $\text{C}=\text{C}$  de anel aromático, assim como bandas a  $1030\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação C-O-C de éter ou éster aromáticos (para flavonóides), e a presença da banda a  $835\text{ cm}^{-1}$  correspondente à deformação angular fora do plano de C-H aromático. As bandas a  $2920\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$  correspondem a estiramentos simétricos de C-H ( $\text{sp}^3$ ) e a estiramentos assimétricos de C-H ( $\text{sp}^3$ ) respectivamente, tais picos podem ser atribuídos a remanentes de ceras presentes no extrato.

### 5.3.2 Análise dos espectros de absorção na região UV-Vis

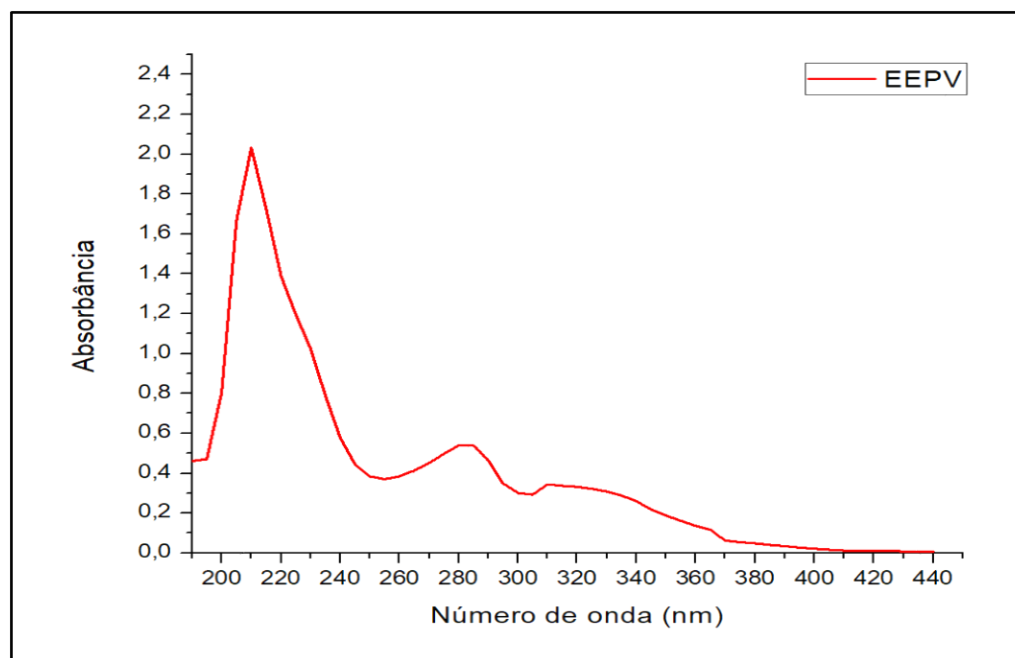
A absorção molecular é um dos parâmetros químicos mais utilizados para classificar e avaliar as própolis, uma vez que as atividades farmacológicas têm sido atribuídas a compostos fenólicos, os quais absorvem entre  $280$  e  $330\text{ nm}$ , entre estes podemos incluir os flavonóides, porém de uma forma específica, descrevem sua ocorrência na faixa de  $281$  a  $284\text{ nm}$  (MOT; SILAGHI-DUMITRESCU; SÂRBU, 2011).

A figura 14 mostra o espectro de absorção na região do UV-visível do EEPV, no qual se observa absorvância máxima na região de  $280\text{ nm}$ , resultado que se relaciona com a absorção da maioria dos flavonóides.

Castro e colaboradores (2007) observaram, em seus estudos, absorções na região de  $279\text{ nm}$  e  $302\text{ nm}$  para os extratos de própolis, valores próximos aos encontrados neste estudo. Silva (2009) define que, mesmo dentro de uma mesma região, diferenças podem ser observadas nos

espectros na região UV, principalmente, em função da variação da composição química da flora local.

**Figura 14 – Espectro de absorção na região do UV-vísivel do EEPV da própolis vermelha.**



Fonte: AUTORA, 2018.

De acordo com Jurd e Geissman (1956), espectros de absorção entre 270 e 330 nm sugerem a presença de flavonoides e fenóis. Os autores reportam as absorções a 276 nm como indicativo da presença de derivados de ácido gálico nos extratos de própolis analisados e observaram ainda bandas de absorção na região do ultravioleta nos espectros de flavonoides com máximos entre 240-285 nm e entre 300-350 nm.

As absorções na região do UV observadas são, reconhecidamente, devidas à presença das duplas ligações em anéis aromáticos (MARKHAM, 1982). Deve-se salientar que apesar de terem sido obtidos espectros contendo bandas de absorção máxima em comprimentos de onda previstos para fenólicos e flavonoides, isto não reflete somente a presença destas classes químicas. Isto se sustenta, pois outros compostos químicos podem conter anéis aromáticos ou insaturações, no mínimo duas, que também promovem a absorção da luz ultravioleta, nos comprimentos de onda citados.

### 5.3.3 Determinação do conteúdo total de fenóis e flavonóides totais

A Tabela 6 apresenta os teores encontrados de fenólicos totais e flavonoides totais da amostra do EEPV. Os teores encontrados foram de 302,0 mg equivalente de ácido gálico por grama para fenólicos totais e de 28,3 mg equivalente de quercetina por g para flavonoides totais.

**Tabela 7- Rendimento do extrato etanolico da própolis vermelha.**

| Amostra           | Fenólicos totais<br>(mg EAG/g de EEPV)<br>média ± DP | Flavonóides Totais<br>(mg QE/g de EEPV)<br>média ± DP |
|-------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Própolis vermelha | 302,0 ± 15,2                                         | 28,300± 0,035                                         |

O resultado está expresso em Média ± Desvio Padrão (dp).

EAG: Equivalente de ácido gálico; QE: equivalente de quercetina

Fonte: AUTORA, 2018.

De acordo com o Anexo VI do Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade da Própolis da Instrução Normativa nº 3 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2001) quanto aos 55 teores de fenólicos e flavonoides totais, os extratos de própolis devem conter, no mínimo, 0,25% de flavonoides e 0,50% de compostos fenólicos. O conteúdo médio de compostos flavonoides e fenólicos foram 2,83 % e 30,2 g%, respectivamente, verificando que a amostra está dentro dos padrões estabelecidos pela legislação quanto a esses dois parâmetros.

Buriol e colaboradores (2009), em seus experimentos em extrato etanólico de própolis com etanol a 70% encontraram valores médios para flavonoides em torno de 2,74% ±0,02 e para fenóis totais, 5,93%±0,01. Melo, Matsuda e Almeida-Muradian (2012), reportam para as própolis da região Nordeste do Brasil, valores entre 0,03% a 3,3% de flavonoides e entre 0,95% a 29,52% para fenólicos totais. Souza e colaboradores (2010) encontraram valores médios de flavonoides de 0,4%.

Salatino e colaboradores (2012), ao investigar própolis vermelha do Estado do Alagoas, encontraram teores de flavonóides de 3,29 mg/100g e de fenóis totais de 41,63 mg/100 g. Lima (2012), em seus experimentos com própolis da região Sudeste do Ceará, relacionou valores de 5,02% a 16,6% para o teor de fenólicos e de 1,4% a 10,1% para flavonoides, referindo-se esses valores à época de coleta, sendo a sazonalidade, um fator importante para colheita de própolis com altos teores de compostos fenólicos, pois em épocas chuvosas o número de espécies botânicas em estado vegetativo é significativamente superior quando comparado ao período seco.

Sousa e colaboradores (2007) relataram que os teores de fenólicos totais e de flavonoides totais podem variar em função de diferentes fatores, tais como o período da coleta da resina, a genética da abelha rainha, a flora local e a região de coleta.

#### 5.3.4 Atividade antioxidante

Os produtos naturais são uma fonte promissora para a descoberta e o desenvolvimento de novas drogas, e o número de patentes está aumentando em relação aos medicamentos comercializados para inúmeras indicações terapêuticas contendo produtos naturais ou derivados, ou produtos sintéticos baseados em algum composto natural (CRAGG, NEWMAN E SNADER, 1997; KOEHN E CARTER, 2005).

Várias patologias estão relacionadas com a oxidação das espécies reativas de oxigênio (EROs) e a própolis vermelha consegue neutralizar esses radicais livres mediante diferentes mecanismos, devido à sua atividade antioxidante. As EROs são geradas de forma local nas células como consequência de reações bioquímicas e de fatores externos, e podem ser neutralizadas por antioxidantes celulares, como as enzimas. O problema aparece quando existe um desequilíbrio na formação das EROs que acarreta um acúmulo destas espécies e que afetam a lipídios, proteínas e DNA. Esta situação é conhecida como estresse oxidativo.

Desta forma, antioxidantes podem contribuir para a neutralização das EROs (HAVSTEEN, 2002; DALEPRANE e ABDALLA, 2013). Os ensaios de atividade antioxidante podem ser classificados em dois tipos conforme o tipo de reação envolvida no processo: ensaios baseados em reações de transferência de um átomo de hidrogênio (HAT) e ensaios baseados na transferência de elétrons (ET). A maioria dos ensaios baseados na HAT aplica um esquema de reação competitiva, onde um antioxidante e um substrato competem por radicais peroxila gerados termicamente na decomposição de compostos azoicos. Os ensaios baseados na ET indicam a capacidade de um antioxidante em reduzir um oxidante que altera sua coloração quando é reduzido, e estão correlacionados com as concentrações das substâncias antioxidantes (HUANG, OU e PRIOR, 2005). A capacidade antioxidante das amostras de própolis vermelha foi avaliada por dois métodos: o ensaio do DPPH (ET) e FRAP.

#### 5.3.4.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)

Dentre os métodos aplicados para avaliação do potencial antioxidante, o método de sequestro do DPPH• é um dos mais utilizados. Este método é considerado simples e rápido, e é empregado em grande parte dos trabalhos que avaliam o potencial antioxidante de substâncias puras e de amostras complexas. Na tabela 7, estão dispostos os resultados da análise de capacidade de sequestro do DPPH• do EEPV, expressos em  $CI_{50}$ , ou seja, a concentração capaz de sequestrar 50% dos radicais livres.

As atividades sequestradoras de radicais livres da amostra do EEPV estão listadas na tabela 7, expressas em DPPH• – $CI_{50}$ . O  $CI_{50}$  da amostra do EEPV mostrou um valor de  $43,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , considerado superior ao  $CI_{50}$  de extrato etanólico de própolis vermelha encontrada por Pinheiro e colaboradores (2009) e Frozza e colaboradores (2013), 294 e  $270 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

Silva e colaboradores (2011) apresentaram valores de 35% de inibição do radical DPPH•, o que indica uma menor atividade do sequestro do DPPH• quando comparada com a obtida neste trabalho. Segundo o autor, uma menor atividade sequestrante do radical DPPH• pode ser devida variações nas concentrações de fenólicos totais e de flavonoides totais.

Laskar e colaboradores (2010) encontraram capacidade antioxidante superior através do método de  $CI_{50}$  para extrato aquoso de própolis, de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  e de  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$  para EEP, sendo que o padrão de ácido gálico utilizado apresentou  $CI_{50}$  de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os flavonoides isolados dessa própolis Indiana, apresentaram valores de  $CI_{50}$  de  $8420 \mu\text{g mL}^{-1}$  de pinocembrina, e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  de galangina. Essa última exibiu ação antioxidante superior ao da pinocembrina, e esta diferença entre os dois flavonoides podem ser atribuídos à presença do grupamento OH no anel C que a galangina possui (MOREIRA, ROGÃO, ESTEVINHO, 2011).

**Tabela 8 - Capacidade antioxidante de extratos do EEPV através da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• e capacidade antioxidante redutora de ferro (FRAP)**

| Amostra | DPPH•                                              | FRAP                                                     |
|---------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|         | CI <sub>50</sub> µgmL <sup>-1</sup><br>Média ± *DP | (mmol de Fe(II) g <sup>-1</sup> paraEEPV)<br>Média ± *DP |
| EEPV    | 43,70 ± 0,06                                       | 147,8 ± 3,0                                              |

Média ±\*DP = desvio padrão

Fonte: AUTORA, 2018.

São apresentados na Tabela 7, os valores médios para a capacidade antioxidante da própolis vermelha analisadas pelo método FRAP.

A capacidade de sequestro de radicais livres das amostras também foi analisada pelo FRAP. Os resultados parecem denotar uma boa ação redutora da própolis, uma vez que forte atividade foi atribuída a ela, a qual atingiu valor de 147,8 mmol de Fe(II) g<sup>-1</sup>paraEEPV. A amostra demonstrou capacidade antioxidante com valores próximos ao encontrado por Xavier e Colaboradores (2015), de 157,7 mmol de Fe(II)g<sup>-1</sup> para própolis vermelha do Estado de Alagoas.

Mohammadzadeh e colaboradores (2007) encontraram valores entre 0,03 a 1,65 mmol de Fe(II) g<sup>-1</sup> para extrato etanólico de própolis Iraniana, valores inferiores aos encontrados neste estudo para as amostras utilizadas.

Os valores de FRAP obtidos nesse trabalho para os EEPV foram superiores aos encontrados por Barlak e colaboradores (2011), onde encontraram para o extrato aquoso de própolis da Turquia 24,1 mmol de Fe(II) g<sup>-1</sup>de extrato seco, e inferiores ao encontrado por Skaba e colaboradores (2013) para o extrato etanólicos de própolis verde Brasileira que foi de 674 mmol de Fe(II) g<sup>-1</sup>de extrato seco.

### 5.3.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa

As composições químicas do EEPV foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) e a identificação dos compostos químicos foi realizada pela comparação direta com padrões autênticos, que foram selecionados a partir da revisão de relatos científicos de compostos fenólicos mais comumente encontrados em outras amostras da própolis vermelha.

Conforme apresentado nos cromatogramas da figura 15, o extrato da propolis vermelha foram identificados 6 flavonóides: Daidzeína, Pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina, bolusontol e Biochanina A.

**Tabela 9– Identificação dos marcadores da própolis vermelha por CLAE-FR.**

| <b>(EEPV 400 µg/mL)**</b> |                    |             |          |                    |
|---------------------------|--------------------|-------------|----------|--------------------|
| <b>Pico</b>               | <b>T. Retenção</b> | <b>Área</b> | <b>λ</b> | <b>Nome</b>        |
| 1                         | 11.71              | 94.460      | 249      | Daidzeína          |
| 2                         | 14.05              | 28.873      | 289      | Pinobanksina       |
| 3                         | 16.57              | 101.914     | 366      | Isoliquiritigenina |
| 4                         | 17.47              | 169.078     | 249      | Formononetina      |
| 5                         | 20.97              | 193.555     | 280      | Bolusontol         |
| 6                         | 22.67              | 29.701      | 249      | Biochanina A       |

Símbolos “+” = presente, mas não identificado;

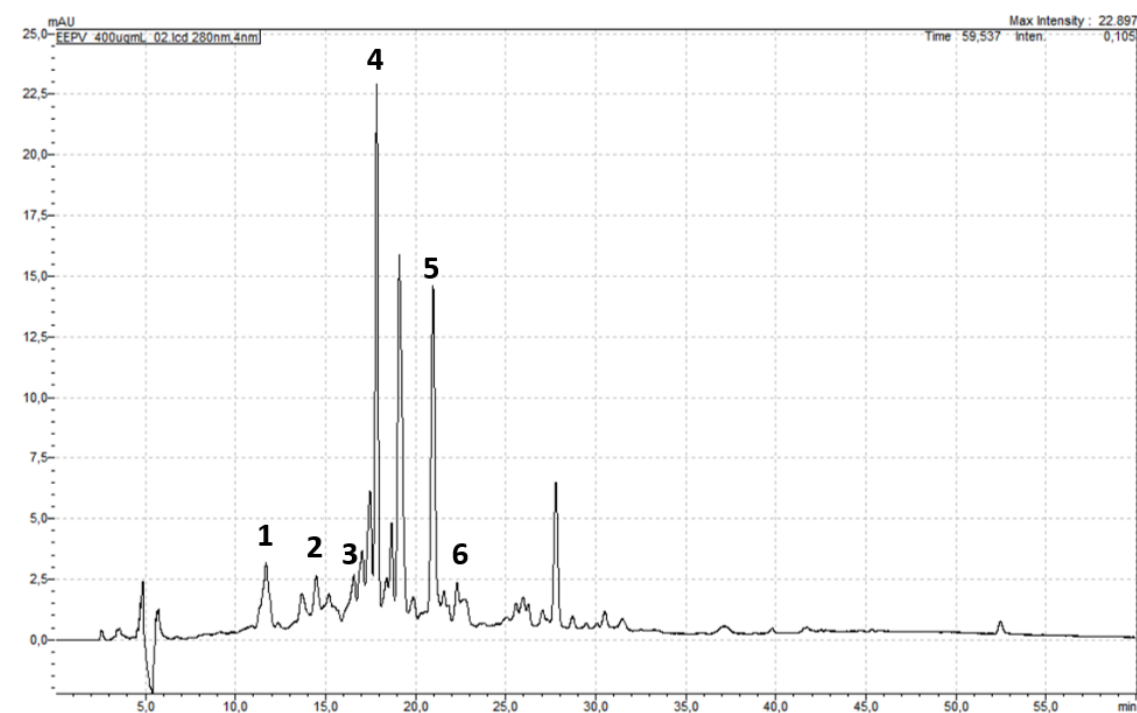
\*\* Percentual comparado com o teor encontrado no EEPV na concentração de 400 µg mL<sup>-1</sup>;

T. Retenção = Tempo de retenção.

Fonte: AUTORA, 2018.

López et al (2014) estudaram 2 amostras de própolis vermelha dos Estado de Alagoas. Os autores, através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de massas identificaram: daidzeína (m/z 253,06), formononetina (m/z 267,06), biochanina A (m/z 283,06) e gutiferona E e xantochimol (m/z 601,35). Dentre os cinco compostos que autores identificaram 03 foram identificados no presente estudo, com exceção apenas da gutiferona E e xantochimol, que não foi identificada no nosso trabalho.

**Figura 15 - Perfil cromatográfico do extrato etanólico da própolis vermelha.**



Fonte: AUTORA, 2018.

## 5.4 Preparação e Análise das Membranas

As membranas foram preparadas a base de biopolímeros e EEPV, obtidos por dispersão dos componentes da fórmula e evaporação do solvente, utilizando-se moldes circulares de 7 cm de diâmetro. Após a evaporação do solvente, as membranas foram facilmente removidas do molde e acondicionadas separadamente para serem posteriormente analisadas.

### 5.4.1 Aspecto e morfologia das membranas

#### 5.4.1.1 Características Macroscópicas das Membranas

Na avaliação das membranas preparadas com e sem o EEPV, nota-se macroscopicamente que apresentaram flexibilidade e coloração adequadas, isto é, as membranas sem a presença do EEPV apresentaram transparência. Nas membranas preparadas com EEPV, consegue-se visualizar a coloração proveniente da própolis e percebe-se uma boa distribuição da coloração o que indica uma homogeneidade na distribuição das partículas por toda a membrana, que pode vir a ser uma característica desejável quando usada no paciente.

Os resultados macroscópicos estão resumidos na Tabela 9. As membranas podem ser visualizadas na Figura 16.

Conforme a Tabela 9 e Figura 16, as membranas com e sem a presença de EEPV apresentaram forma contínua e homogênea, ou seja, sem ruptura após a eliminação do solvente. Não foram observadas partículas insolúveis.

**Tabela 10- Comparação dos aspectos macroscópicos das membranas.**

| <b>Característica</b>                  | <b>Membrana sem EEPV</b> | <b>Membrana com EEPV</b> |
|----------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Cor                                    | Transparente             | Avermelhada              |
| Uniformidade                           | xxx                      | xxx                      |
| Presença de bolhas                     | 0                        | 0                        |
| Presença de rachaduras                 | 0                        | 0                        |
| Aspecto quebradiço                     | 0                        | 0                        |
| Flexibilidade                          | xxx                      | xx                       |
| Facilidade de se desprender do suporte | xxx                      | xx                       |

Legenda: 0–ausência; X-pouco; XX- médio; XXX- intenso.

Fonte: AUTORA, 2018.

**Figura 16 – Características macroscópicas das membranas preparadas com EEPV.**



Fonte: AUTORA, 2018.

#### 5.4.1.2 Análise Morfológica

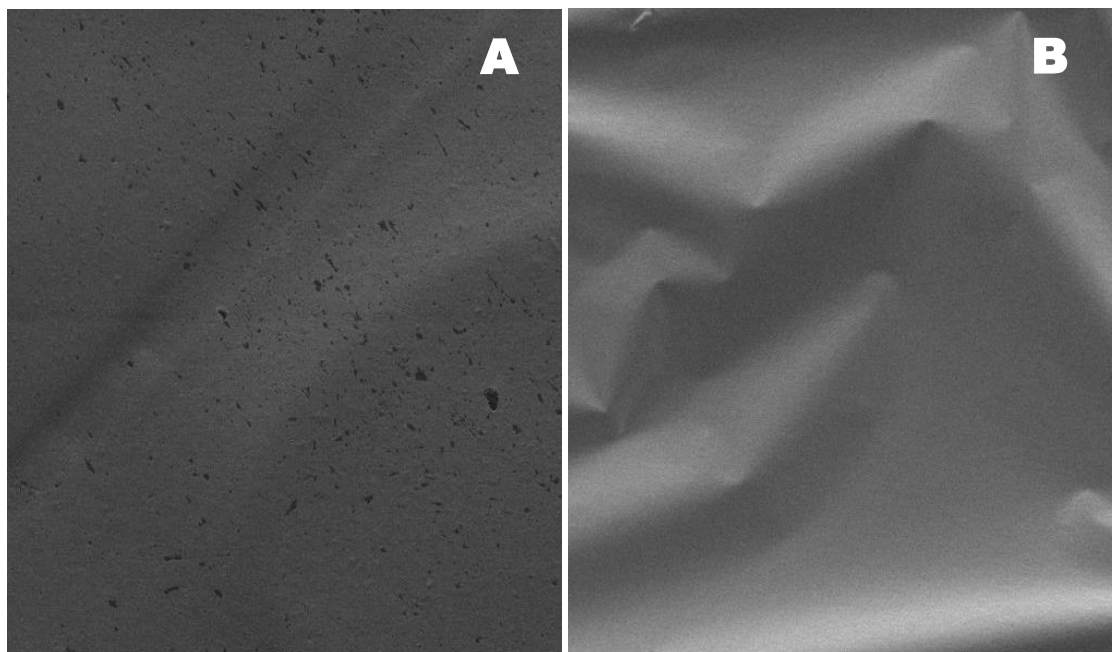
Na Figura 17 são mostradas as imagens obtidas por microscopia óptica e por microscopia eletrônica de varredura das membranas preparadas com e sem EEPV .

As imagens obtidas por microscopia óptica mostram a presença de cavidades na superfície das membranas obtidas com e sem a presença de EEPV. Aparentemente, as cavidades podem indicar a distribuição dos polímeros de forma irregular. No entanto, nenhuma delas apresentou rupturas nas suas paredes, o que indica que elas não se romperam durante o processo de evaporação do solvente. Contudo, as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), mostradas na Figura 17, mostram que existem diferenças entre as morfologias das membranas preparadas na presença e na ausência de EEPV. Nota-se que, apesar de ambas as formulações apresentarem a mesma composição de polímeros, a adição do EEPV aumentou a compactação do material tornando a superfície mais lisa e compactada.

As imagens de MEV indicam que as membranas com EEPV possuem estrutura lamelar e que não apresentam poros que possam atravessar integralmente a sua espessura, característica que favorece a aplicação do biomaterial no tratamento de lesões de pele, uma vez que a penetração de microrganismos na ferida seria evitada (BUENO e MORAES, 2011; HINRICHS et al., 1992).

Observou-se que com a adição do EEPV dissolvido em etanol houve menor retenção de ar durante a agitação mecânica da mistura polimérica, levando conseqüentemente à redução do tamanho dos poros do material e à diminuição do espaçamento entre as camadas observadas na estrutura transversal da membrana. A espuma formada pela mistura polimérica durante o preparo da membrana tornou-se ainda menos estável, reduzindo a formação de bolhas e, conseqüentemente, evitando a formação de poros durante a secagem do material em estufa (BUENO, 2015).

**Figura 17 – Fotomicrografia da superfície das membrana com (A) e sem (B) a presença de EEPV, obtida por MEV com aumento de 125x.**



Fonte: AUTORA, 2018.

Com base nas fotomicrografias obtidas em MEV, não se notou separação/domínio de fases na membrana à base de EEPV, sendo isso um forte indicativo de formação de membranas miscíveis dos polímeros usados. Resultados similares foram obtidos por outros pesquisadores com membranas de polímeros semelhantes (YEH et al., 2006).

#### 5.4.2 Espessura das membranas

A espessura das membranas está indicada na Tabela 10. Considerando o processo de fabricação das membranas, pode-se concluir que as membranas com e sem EEPV não apresentaram grande diferença de espessura e que com a incorporação da solução do EEPV não houve alteração significativa na espessura das membranas.

A uniformidade da espessura da membrana é fator importante para que os componentes da membrana fiquem distribuídos de forma uniforme. É também interessante para aplicação em feridas de pele, estando relacionada com a propriedade de barreira das membranas. As membranas muito finas alteram a flexibilidade das mesmas, podendo fazer com que rasguem com facilidade,

o que não é interessante para recobrimento de feridas na pele, já que o importante é se ter membranas finas e resistentes.

As propriedades de barreira são importantes, ou seja, estão relacionadas com a dispersão homogênea dos componentes na matriz polimérica. Se a membrana estiver muito espessa dificulta a permeação, enquanto a menor espessura facilita o processo.

**Tabela 11 - Espessura das membranas em  $\mu\text{m}$  com e sem a presença de EEPV.**

| Amostras<br>(Membranas) | Espessura ( $\mu\text{m}$ )<br>Média $\pm$ *dp |
|-------------------------|------------------------------------------------|
| Com EEPV                | 2,6 $\pm$ 0,6                                  |
| Sem EEPV                | 2,5 $\pm$ 1,1                                  |

Média  $\pm$ , \*dp = desvio padrão

Fonte: AUTORA, 2018.

Segundo estudos de Uygun e colaboradores (2010), a espessura das membrana é uma variável importante, porém pouco discutida na engenharia de tecidos. Seu estudo demonstrou que a espessura da membrana, quanto mais espessa, mais irá influenciar na proliferação celular, além de diminuir a cristalinidade das membranas tornando-as também mais aderentes, entretanto membranas maiores que 120  $\mu\text{m}$  não obtiveram bons resultados.

#### 5.4.3 Umidade

Devido à sua natureza hidrofílica, os polissacarídeos são altamente receptivos à umidade (KUREK et al, 2012). Membranas a base de NaCMC são capazes de absorver até 40% de umidade dependendo das condições (AGUIRRE-LOREDO et al., 2016). Entretanto, uma grande porcentagem de umidade pode ser desfavorável, pois pode acelerar a degradação da membrana por ataque de microrganismos.

Na análise do teor de umidade nas membranas com EEPV, no método de secagem, encontrou-se o rendimento de massa entre a massa inicial e final de 67,87% (massa inicial = 36,3mg e massa final = 24,66mg), ou seja, a umidade em torno de 32,12%, valor menor quando comparado ao valor de 73% de umidade apresentado por Maina, Heide e Shagal (2012).

Os resultados deste estudo (Tabela 11) mostram que a quantidade de umidade da membrana com a presença de EEPV é menor que a as membranas sem a presença do EEPV. Tal fato corrobora

com os resultados do MEV que demonstraram uma melhor compactação das membranas pela presença de etanol no processo de secagem e, portanto, maior eficiência de secagem.

**Tabela 12 – Teor de umidade das membranas.**

| Amostra/membrana  | Umidade (%)<br>Média ± *dp |
|-------------------|----------------------------|
| Membrana sem EEPV | 38,05 ± 3,2                |
| Membrana com EEPV | 32,12 ± 5,1                |

Fonte: AUTORA, 2018.

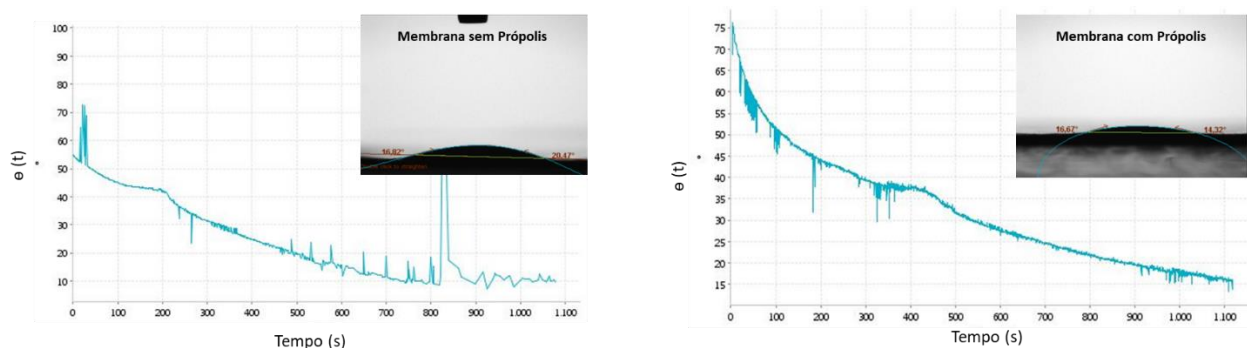
#### 5.4.4 Molhabilidade

A caracterização da molhabilidade é fundamental para inferir nas propriedades de molhabilidade das membranas e indicar o perfil de absorção de umidade, uma vez que este é um requisito importante, considerando a liberação do fármaco.

Na Fig. 18 é apresentada a dinâmica de molhabilidade da membrana com e sem a presença de própolis. As medidas foram realizadas a uma temperatura de 26°C. A superfície das membranas apresentam uma alta hidrofiliicidade, resultando em um alto ângulo de contato de estático, com  $\theta^\circ = 10,63^\circ$  (Membrana sem Própolis) e  $\theta^\circ = 15,50^\circ$  (Membrana com Própolis).

Neste caso, é possível observar que o ângulo de contato relaxa rapidamente para o seu valor de estático para ambas as membranas. Isto pode estar diretamente associado à porosidade do substrato e a capacidade de absorção de umidade dos componentes da formulação.

**Figura 18 - Dinâmica de molhabilidade das membranas com a presença e sem a presença de própolis vermelha.**



Fonte: AUTORA, 2018.

#### 5.4.5 Grau de Intumescimento

O fenômeno do intumescimento é devido à hidratação dos grupos hidrofílicos do CMC e da pectina, sendo que o primeiro possui maior capacidade de intumescimento. A água penetra na estrutura do material, preenchendo os espaços vazios entre as cadeias poliméricas e provocando a relaxação da matriz devido à pressão osmótica. O equilíbrio é atingido quando a pressão osmótica se iguala às forças de ligação que mantém a estrutura polimérica estável (PASPARAKIS e BOUROPOULOS, 2006).

A hidrofobicidade é uma propriedade muito marcante nessas membranas, devido à presença de grupamentos carboxílicos (-COOH) e amidas (-CONH<sub>2</sub>). Estes grupamentos favorecem o intumescimento, através da formação de ligações de hidrogênio com água (SPERLING, 2001).

Devido ao grande poder de intumescimento característicos das membranas à base de CMC e pectina, foi adotado o uso da solução tampão salina (0,9% NaCl) como solvente para este ensaio, visto que a presença de íons em todos os fluidos (com exceção da água) pode induzir à blindagem de cargas dos polissacarídeos, reduzindo a repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas, originando uma estrutura mais empacotada e menos hidrofílica, com menor capacidade de absorção de líquidos (MAURSTAD et al., 2008; BARTKOWIAK, 2002; STRAND et al., 2001). Além disso, o gradiente de força iônica no caso das soluções salinas é maior, o que reduz o fluxo de água para dentro da matriz polimérica, conferindo assim, resultados mais confiáveis (ZOR et al., 1998).

O comportamento das membranas foi avaliado na presença de solução salina (NaCl a 0,9% m/v), PBS, fluido corpóreo simulado (FCS), meio RPMI suplementado e soro fetal bovino (SFB). Primeiramente, avaliou-se a cinética de intumescimento das membranas em água a 37°C. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 19.

A tabela 12 mostra o resultado do grau de intumescimento das membranas com e sem a presença de EEPV, onde se observa que a adição do EEPV não modifica os resultados. Os perfis de intumescimento entre as membranas são similares. Comparando os dados de intumescimento entre as membranas contendo EEPV e as membranas sem EEPV, nota-se que a incorporação do ativo nas membranas não conferiu alteração no perfil e nos valores máximos de intumescimento.

Quando comparado o grau máximo de intumescimento das membranas, observa-se que ambas mostraram valores próximos, sendo as membranas sem a presença de EEPV, com absorção máxima de 2912,36 % e as membranas a base de EEPV com absorção máxima de 3002,22 %. As

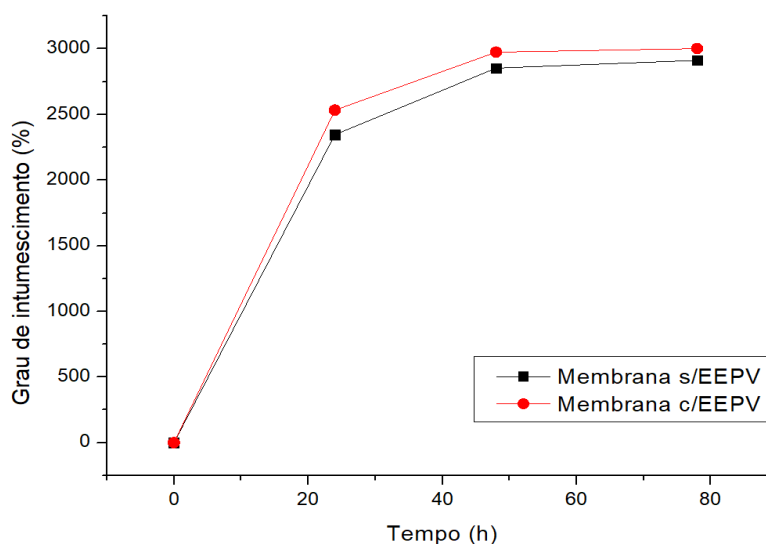
membranas estudadas apresentaram, em geral, maiores valores de capacidade de absorção em comparação aos dados anteriores reportados por Bueno (2010), que foram de 1383%, para membranas preparadas com pluronic F68 a 1:1 (m/m) em relação à massa de polissacarídeos.

**Tabela 13 - Grau de intumescimento das membranas em relação ao tempo de intumescimento (n=3).**

| Tempo (horas) | Grau de intumescimento (%) |                 |
|---------------|----------------------------|-----------------|
|               | (Média ± dpr*)             |                 |
|               | Sem EEPV                   | Com EEPV        |
| 0             | 0                          | 0               |
| 24            | 2345,56 ± 12,54            | 2532,65 ± 25,65 |
| 48            | 2854,36 ± 10,12            | 2975,08 ± 6,43  |
| 72            | 2912,36 ± 9,01             | 3002,22 ± 9,22  |

Fonte: AUTORA, 2018.

**Figura 19- Cinética de intumescimento em PBS (0,9%) a 37°C das membranas preparadas na ausência e na presença do EEPV.**



Fonte: AUTORA, 2018.

Os valores de capacidade máxima de absorção de água obtidos nestes ensaios são comparáveis aos curativos produzidos por Rodrigues e colaboradores (2008), que absorveram de 1100 a 1900%. Altos valores de capacidade de absorção de água também foram reportados por

Tanodekaew e colaboradores (2004) para um hidrogel de  $\beta$ -quitina e poliácido acrílico, que variaram de 3000% a 6000%, dependendo do conteúdo de ácido acrílico.

Como conclusão das análises de capacidade de absorção de umidade das membranas em solução PBS (0,9%), pode-se assumir que seriam mais adequadas para aplicações que requeiram alta capacidade de absorção de fluidos, por exemplo, no caso de feridas exsudativas, ou ainda, para aplicações em que o aspecto poroso seja desejável para permitir crescimento celular, como no caso dos *scaffolds*, sendo desejável também que o material apresente taxa de degradação adequada quando em contato com fluidos fisiológicos.

#### 5.4.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

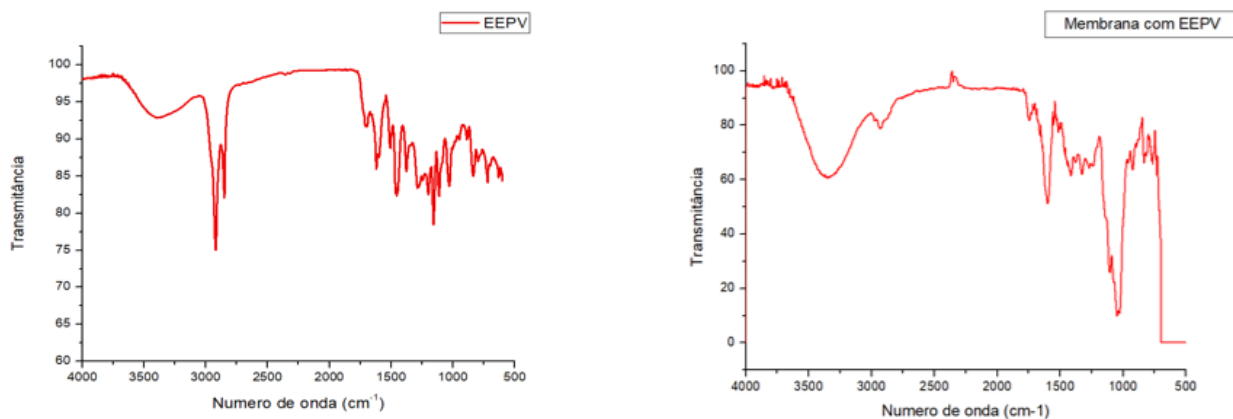
A técnica de FTIR foi utilizada para avaliar a presença de EEPV e incorporação na formação do complexo polimérico aplicado na preparação da membrana.

Na Figura 20, são mostrados os espectros de absorção no infravermelho (FTIR) do EEPV e da membrana. Na Tabela 13 encontram-se os picos de absorção característicos, que podem ser utilizados para identificar os compostos presentes nas membranas.

Como pode ser observado, ambos os espectros de absorção mostram uma banda larga na região de  $3420 - 3355 \text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente. De acordo com Lawrie e colaboradores (2007), esta banda pode ser atribuída ao estiramento dos grupos -OH, hidroxila típica de fenóis. O pico a  $2937 \text{ cm}^{-1}$  representa as vibrações dos grupos metila e metileno, presentes também no EEPV (SANKALIA et al., 2007; LAWRIE et al., 2007). As bandas de absorção  $1618 \text{ cm}^{-1} - 1502 \text{ cm}^{-1}$  decorrentes de C=C de anéis aromáticos e em  $1160 - 1016 \text{ cm}^{-1}$ , houve a presença da banda de deformação axial de C-O, a banda de absorção em  $836 \text{ cm}^{-1}$  mostrou a deformação angular C-H fora do plano, característica de compostos aromáticos polinucleares, comuns a vários dos compostos utilizados para o preparo das membranas.

Foram identificadas, na membrana, as bandas características do EEPV, confirmando que houve a incorporação do extrato com os excipientes. As bandas  $3331 - 2911 \text{ cm}^{-1}$  que podem ser características carbonos primários e terciários ( $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ ) e de  $1619$  e  $1601$  de anéis aromáticos (C=C) e  $1036$  e  $836$  de álcoois primários, de éter tipicamente característico de EEPV.

**Figura 20 - Espectros de FTIR para o extrato etanólico de própolis vermelha (EEPV) e membrana à base de EEPV.**



Fonte: AUTORA, 2018.

**Tabela 14- Tabela da relação entre os valores das bandas de absorção no FTIR e os grupos químicos encontrados nas formulações atomizadas e o extrato de própolis vermelha.**

| Bandas (cm <sup>-1</sup> ) | Grupos químicos                                                     | Material                     |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 3355                       | OH                                                                  | Membrana                     |
| 2936                       | CH <sub>3</sub> / CH <sub>2</sub>                                   |                              |
| 1618 - 1502                | C=C aromáticos                                                      |                              |
| 1032                       | C-O (álcoois primários, de éter alifático e cíclico)                |                              |
| 836                        | C-H (deformação angular fora do plano, de aromáticos polinucleares) |                              |
| 3336                       | -OH                                                                 | Extrato de Própolis Vermelha |
| 2911                       | CH <sub>3</sub>                                                     | Extrato de Própolis Vermelha |
| 1619                       | CH <sub>3</sub>                                                     | Extrato de Própolis Vermelha |
| 1601                       | C=C aromáticos                                                      | Extrato de Própolis Vermelha |
| 1036                       | C-O (álcoois primários, de éter alifático ecíclico)                 | Extrato de Própolis Vermelha |
| 836                        | C-H (deformação angular fora do plano, de aromáticos polinucleares) | Extrato de Própolis Vermelha |

Fonte: AUTORA, 2018.

#### 5.4.7 Determinação da eficiência de incorporação de EEPV nas membranas

Para determinar a eficiência de incorporação do EEPV nas membranas foi determinado o teor de fenóis totais das membranas.

O teor dos fenóis totais recuperados, após a extração, em membranas a base de EEPV está representado na Tabela 14. A quantidade de recuperação total dos fenóis totais foram de entre 89,6 e 92,0 % da quantidade teórica.

Conforme pode ser observado na Tabela 14, a adição de EEPV na matriz da membrana foi bem sucedida, visto que apresentaram uma retenção de fenóis totais superior a 60% que, segundo Bhandari e colaboradores (2006) e Kenyon e Anderson (1988), está proporção de retenção é considerada ótima para formulações, contendo polímeros.

A associação da mistura entre CMC e pectina como agentes promotores da formação das membranas mostrou ser eficiente na adesão do EEPV. Tal fato confirma os relatos de Shahidi e Han (1993), que afirma sobre a necessidade de associação de dois ou mais materiais de revestimento para garantir maior retenção e melhor estabilidade de produtos.

**Tabela 15 - Eficiência de incorporação de EEPV nas membranas.**

| Amostra/membrana  | Teor dos fenóis totais recuperados (%) |
|-------------------|----------------------------------------|
|                   | Média $\pm$ *dp = desvio padrão        |
| Membrana com EEPV | 90,84 $\pm$ 1,16                       |

Média  $\pm$  \*DP = desvio padrão

Fonte: AUTORA, 2018.

#### 5.4.8 Cinética de liberação de EEPV incorporado nas membranas

A cinética de liberação de agentes ativos contidos em membranas pode ser analisada através da determinação de sua concentração em um meio líquido extrator de composição apropriada. O tampão PBS é bastante utilizado para esta finalidade por possuir pH igual a 7,4, simulando condições fisiológicas, como por exemplo, no caso de uma ruptura da pele.

Com o intuito de se determinar o perfil de liberação dos componentes do EEPV, foram realizados testes de liberação *in vitro* para a membrana. Para a realização deste ensaio, amostras de massas e diâmetro conhecidos (2cm) contendo EEPV foram previamente pesados e colocados em béqueres com 50 mL de solução tampão fosfato salina (pH= 6,86).

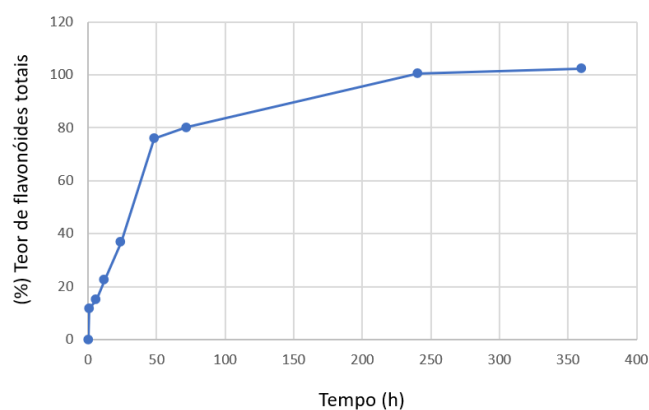
**Tabela 16- Quantificação de conteúdo de flavonóides totais liberados pelas membranas em relação ao tempo.**

| Tempo (horas) | Teor de flavonóides totais (%) |
|---------------|--------------------------------|
|               | média ± *DP                    |
| 1             | 11,64± 6,32                    |
| 6             | 15,01± 3,12                    |
| 12            | 22,49± 1,85                    |
| 24            | 36,95± 3,86                    |
| 48            | 75,93± 5,09                    |
| 72            | 80,18± 6,26                    |
| 240           | 100,48 ± 7,58                  |
| 360           | 102,20± 2,32                   |

\*dp = Desvio padrão

Fonte: AUTORA, 2018.

**Figura 21- Perfil de liberação de flavonóides totais da membrana em função do tempo.**



Fonte: AUTORA, 2018.

Os flavonoides são as principais substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas da própolis (BURIOL *et al.*, 2009). Sendo assim, conhecer a cinética de liberação desses compostos é fundamental para prever como ocorrerá a liberação desse fármaco na superfície ferida, nos posteriores testes *in vivo*.

Ainda sobre a liberação de flavonóides totais, levando em consideração a quantidade de flavonóides totais presente nas membranas completamente solubilizadas e considerando esses valores como a porcentagem máxima de liberação, foi possível avaliar a porcentagem de flavonóides que a membrana liberou em função do tempo. Os resultados podem ser observados na Tabela 15 e no gráfico representado na Figura 21.

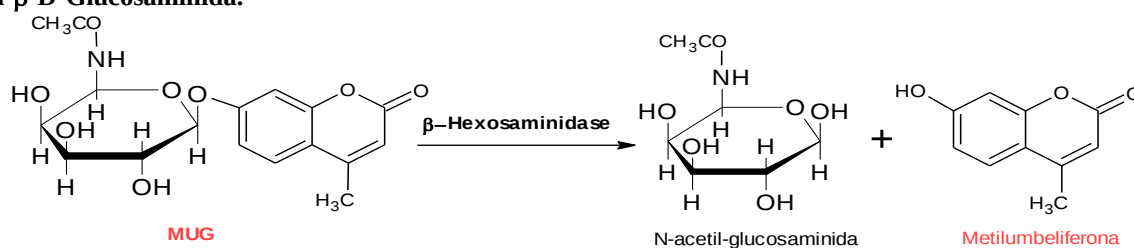
A liberação de flavonoides totais em relação ao tempo mostrou resultados consideravelmente positivos no decorrer das horas em que o teste foi realizado. A membrana liberou gradativamente os flavonóides até o platô de 240 horas onde a liberação se estabilizou.

## 5.5 Ensaios Biológicos

### 5.5.1 Ensaios de potencial antialérgico

O potencial alergênico, *in vitro*, do extrato (EEPV) e da formulação (MEPV) foram avaliados pelo ensaio direto de liberação da enzima  $\beta$ -hexosaminidase em mastócitos da linhagem RBL-2H3 (NAAL et al, 2004). A liberação estimulada da enzima  $\beta$ -hexosaminidase foi quantificada pela reação com o substrato metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (MUG), a qual gera o produto fluorescente metilumbeliferona (Figura 22), quantificado em um leitor de fluorescência para microplacas. Compostos que estimulam a liberação da enzima  $\beta$ -hexosaminidase são ditos compostos com potencial alergênico e aqueles que inibem a desgranulação e a consequente liberação de  $\beta$ -hexosaminidase são ditos compostos com potencial antialérgico.

**Figura 22 – Reação de produção do N-acetilglucosaminida e metilumbeliferona a partir do metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-Glucosaminida.**

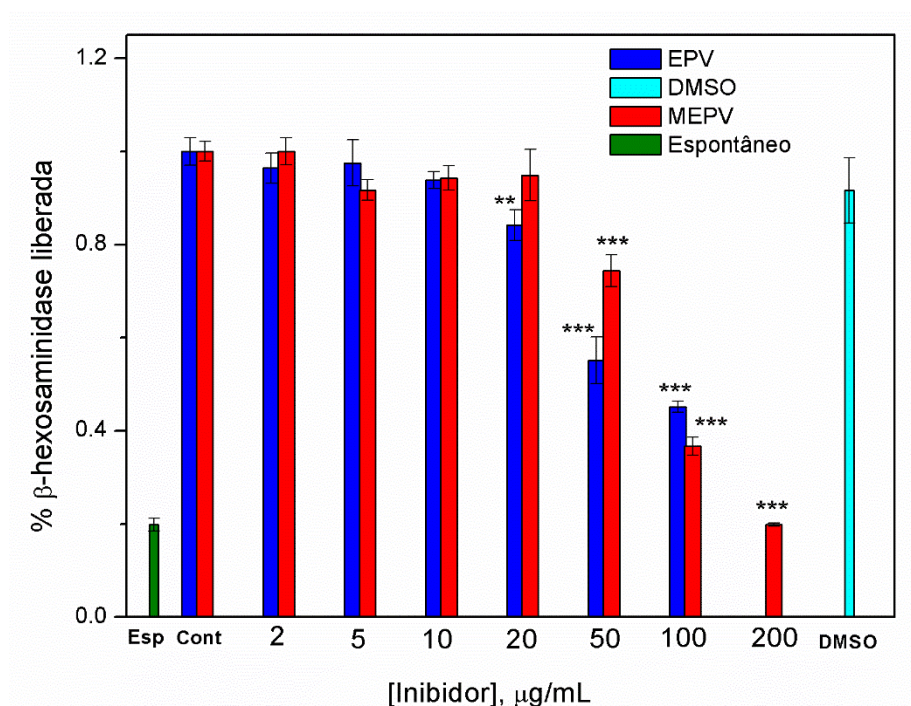


Fonte: AUTORA, 2018.

O EEPV (2 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ) assim como a Membrana a Base de Propolis Vermelha (MEPV) (2 a 200  $\mu\text{g/mL}$ ) não estimulam a desgranulação, *in vitro*, de mastócitos e a liberação de mediadores químicos das alergias (Figura 22), o que indica que o produto desenvolvido não apresenta propriedades alergênicas e pode ser usado com segurança para as aplicações farmacológicas pretendidas. Para concentrações de EEPV e MEPV tais como 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  nota-se discreta inibição da desgranulação mastocitária, a qual é favorecida no caso de alta concentração da membrana (100 – 200  $\mu\text{g/mL}$  de MEPV), devido, provavelmente, à maior solubilidade do extrato incorporado comparado ao extrato livre. Para a concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  de MEPV, por

exemplo, observa-se forte inibição da desgranulação enquanto que para o extrato livre, nesta mesma concentração, o ensaio biológico não pode ser realizado em função da baixa solubilidade do extrato (EPV), em tampão fisiológico. Assim, pode-se dizer que a membrana desenvolvida, contendo o extrato de própolis vermelha, ou seja, a MEPV, além de não ser alergênica, pode aumentar a solubilidade do extrato e contribuir para a inibição moderada de reações alérgicas quando usada em concentrações acima de 50 µg/mL (Figura 23).

**Figura 23 - Porcentagem de  $\beta$ -hexosaminidase liberada para as células estimuladas pelo antígeno DNP-BSA (0,1 µg/mL) na presença de diferentes concentrações de inibidores (EPV e MEPV).**



Fonte: AUTORA, 2018.

Nesta curva, as barras de erro representam o desvio padrão para amostras em triplicata, quadruplicata ou quintuplicata de um único experimento.

Devido à sua característica biológica comprovadamente cicatrizante em células de fibroblastos, as membranas obtidas pelos processos propostos podem ser utilizadas para: tratamento de infecções bacterianas de amplo espectro de ação; tratamento de processos inflamatórios de origem bacteriana; tratamento de feridas; tratamento de processos inflamatórios e infecciosos, em geral na pele.

Os usos aqui descritos apresentam-se como novidade ao estado da técnica, em termos de atividades e atuação da própolis vermelha como produto farmacêutico (membrana).

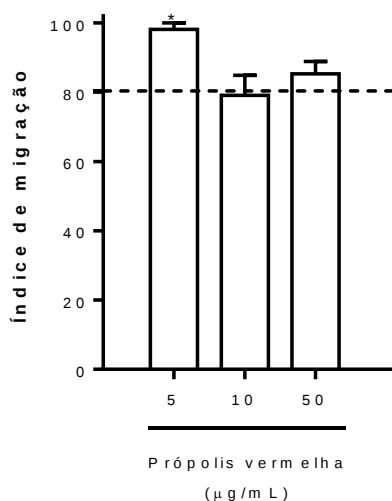
Assim, as modalidades da invenção descritas no presente documento apresentam-se como um avanço no estado da técnica já que, permitem a produção de MEPV e composições farmacêuticas contendo os mesmos de maneira economicamente viável. Desta forma, as MEPV obtidos através do processo proposto podem ser utilizadas em diversos setores industriais da área cosmética e farmacêutica.

#### 5.5.2 Determinação da atividade cicatrizante *in vitro*

Para determinar a influência do tratamento das membranas a base de própolis vermelha sobre a migração de fibroblastos, as células foram submetidas ao tratamento com as amostras da membrana por 24 h. Após este período, o índice de migração foi estimado pelo ensaio de migração horizontal.

A migração dos fibroblastos quando na presença de das membranas enriquecidas com EEPV, nos tempos de 0 e 24 h, pode ser observada nas figuras abaixo. A diminuição da área da ferida ao longo de 24 h foi vista na Figura 24, na forma de uma observação representativa. A demonstração dos dados deste ensaio de migração celular *in vitro* encontra nas Figura 24.

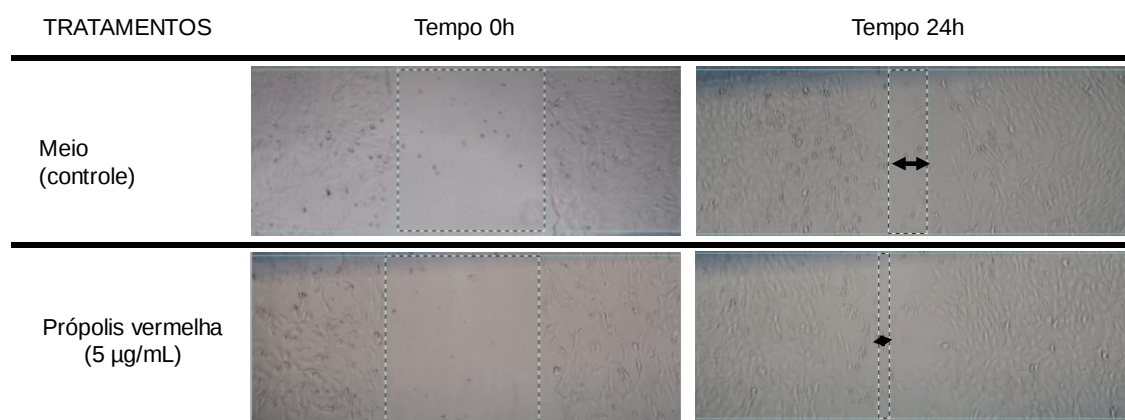
**Figura 24 - Efeito do tratamento com própolis vermelha ou própolis vermela sobre a migração de fibroblastos *in vitro*.**



Fonte: AUTORA, 2018.

Células mantidas apenas com meio DMEM (linha tracejada) foram consideradas como controle do experimento. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. \*  $P < 0,01$  e \*\*  $P < 0,05$  quando comparado as células tratadas com veículo (barra branca).

**Figura 25 - Fotomicrografias representativas do efeito da própolis vermelha ou própolis vermelha/Aloe-vera sobre a migração de fibroblastos *in vitro*. As setas indicam a área livre de células no tempo de 24h comparado ao respectivo tratamento no tempo de 0h. As imagens foram obtidas em microscopia de contraste de fase, aumento de 100X.**



Fonte: AUTORA, 2018.

Analisando-se as Figuras 24 e 25, conclui-se que a presença de EEPV é relevante na aceleração do fechamento da ferida. Observou-se que a concentração de EEPV influencia diretamente na diminuição da área. A presença de baixas concentrações EEPV permite que os fibroblastos migrem mais rapidamente do que em altas.

Não foram encontrados registros na literatura sobre o ensaio de migração celular *in vitro* utilizando própolis vermelha incorporada em membranas.

O comportamento de células cutâneas pode ser investigado com o uso de cultura de células, como os queratinócitos (KEIRA et al., 2004). Em tecidos normais, o colágeno fornece a força, a integridade e a estrutura. Quando os tecidos são rompidos após a ferida, o colágeno é necessário para reparar o defeito e restabelecer a estrutura anatômica e a função. Neste sentido, novos materiais podem ser utilizados na medicina para reparação do dano ou trauma químico-mecânico, da pele ou mucosas devido à sua biocompatibilidade e sua capacidade de promover cicatrização de feridas. Ainda não há indicações claras do seu mecanismo de ação da própolis, sobretudo incorporada em membranas poliméricas, mas acredita-se que seja promovido pela ação protetora

dos polímeros associado a destacada atividade cicatrizante da própolis, que proporciona condições favoráveis para a cura de feridas e regeneração tecidual. Desta forma, novos estudos *in vitro* e *in vivos* são necessários, pois poderão promover o entendimento de sua interação com os tecidos (WANET et al., 2007).

Como reportado por Osman e colaboradores (2007) e Muangman (2011), o potencial de cicatrização da membrana a base de própolis vermelha é evidenciado por meio destes resultados. Ressalta-se que a porcentagem é estatisticamente igual à demonstrada pelas membranas biopoliméricas. Lin e colaboradores (2013) realizaram testes *in vitro* com membranas de nanocelulose e quitosana e foi observada a reparação tecidual de 30% a 48 h. Souza (2013) realizou testes *in vivo* utilizando membranas de nanocelulose e colágeno bovino e a reparação tecidual em 72 h foi de 20%. Comparado a estes, o produto biopolimérico desenvolvido neste trabalho pode se tornar mais promissor quando aplicado em animais e humanos, uma vez que em apenas 24 h foi observada uma porcentagem de migração celular de 20%.

## 6 CONCLUSÕES

A própolis vermelha se apresenta como um importante produto natural rico em compostos fenólicos. Neste trabalho foi possível estabelecer as seguintes conclusões de acordo com os objetivos definidos:

É possível incorporar o extrato etanólico da própolis vermelha em matrizes poliméricas para obtenção de membranas;

Não houve alterações significativas na qualidade e quantidade dos teores fenólicos e flavonóides totais, após o processo de preparação das membranas, mantendo-se a integridade do extrato etanólico da própolis.

O extrato etanólico, assim como as membranas a base de própolis vermelha, apresentaram atividade antioxidante acentuada, correlacionando-se com o teor dos compostos fenólicos;

A autenticidade da própolis vermelha foi comprovada pela identificação de marcadores majoritários, como a Liquiritigenina, Daidzeína, Pinobanksina, Isoliquiritigenina, Formononetina, Bolusontol e Biochanina A;

A membrana desenvolvida, contendo o extrato de própolis vermelha, além de não ser alergênica, pode aumentar a solubilidade do extrato e contribuir para a inibição moderada de reações alérgicas quando usada em concentrações acima de 50 µg/mL;

A membrana constituída de EEPV permite a aceleração do fechamento da ferida em testes *in vitro*, assegurando sua importância na migração dos fibroblastos permitindo o fechamento das feridas.

Neste cenário, devido à sua característica biológica comprovadamente cicatrizante em células de fibroblastos, as membranas obtidas pelos processos propostos podem ser utilizadas para: tratamento de feridas; de processos inflamatórios e infecciosos, em geral na pele.

Assim, as modalidades da invenção descritas no presente documento apresentam-se como um avanço no estado da técnica já que permitem a produção de MEPV e composições farmacêuticas contendo componentes economicamente viáveis, podendo ser utilizadas em diversos setores industriais cosmética e farmacêutica.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGUIRRE. R.Y, Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films, Food Chemistry, volume 196, pages 560-566. 2016
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and, metabolism. Nutrition. New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AHN, Y.H., S.J. LEE, K.M. SHIN, AND E.J. PARK. The Vegetation and Flora of Village Groves in Paengseong-eup, Pyongtaek City, Gyonggi-Do, Korea. Journal of Korean institute of Environment Ecology 21(6):515-525. 2007
- ALVES, H.; MACHADO, M. T.; NORONHA, A. N. W. Análise quantitativa do processo de reparo em cicatriz cirúrgica de ratos tratados com extrato de Musa sapientum, Aloe vera, colagenase e placebo. Revista Ciências em Saúde, v.1, n. 2, jul. 2011.
- ALVIM N.A.T, et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. Rev Latino-am Enfermagem maio-junho; 14(3), 2006.
- ANDREA CECILIA DORIAN RODAS, Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmico, Tese Universidade de São Paulo, 2004
- ANITHA, A., MAYA, S., DEEPA, N., et al., "Efficient water soluble O-carboxymethyl chitosan nanocarrier for the delivery of curcumin to cancer cells", Carbohydrate Polymers, v.83, pp.452–461, 2011. Não achei 2014
- BALBINO, C.A. et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas, v.41, n.1, p.27-51, 2005.
- BANKOVA V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol 100: 114-117. 2005
- BARCELLOS I.O, SOUZA A.C, SELKE. A.E., Departamento de Química, Universidade Regional de Blumenau. Incorporação de Lodo Industrial em Compósitos de Resina Poliéster. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 19, nº 2, p. 155-159, 2009
- BARSUMIAN E. L., ISERSKY C., PETRINO M. G. AND SIRAGANIAN R. P. IgE-induced histamine release from rat basophilic leukemia cell lines: isolation of releasing and nonreleasing clones. Eur. J. Immun. 11, 317-323. 1981.
- BASTOS, E. M. A. F.; SIMONE, M.; JORGE, D. M.; SOARES, A. E. E.; SPIVAK, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against Paenibacillus larvae. Journal of Invertebrate Pathology, Marceline, v. 97, n. 3, p. 273-281, 2008.

BAYARRI, M.; OULAHAL, N.; DEGRAEVE, P.; GHARSALLAOUI, A. Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging. *Journal of Food Engineering*, v. 131, p. 18-25, 2014.

BEHLING E.B; Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004

BELLINI, M.Z.; CALIARI-OLIVEIRA, C.; MAZUKAMI, A.; SWIECH, K.; COVAS, D. T.; DONATI, E. A.; OLIVA-NETO, P.; MORAES, A. M. Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 29(8), p. 1155- 1166, 2015

BENZIE, I. AND STRAIN, J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76. 1996.

BERLINCK R. G. S., et al. A química de produtos naturais do brasil do século XXI, *Quim. Nova*, Vol. 40, No. 6, 706-710, 2017

BHANDARI, R.M., N. Jong-Anurakkun, G. Hong and J. Kawabata,.  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Parkhanbhed (*Bergenia ciliate*, Haw). *Food Chem.*, 106: 247-252. 2008

BIASOTTO, M.E. MENDES. L.C, *Introdução a Polímeros*. Ed. 2º Edgar B. Cherum, 1999.

BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharma. Sci.* [online], v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BORGES E.L, et al., *Feridas: Como tratar*. 2 Ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica*. Brasília, 2012.

BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Anexo 06: Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 23 jan. 2001.

BRASIL. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº. 3, de 19 de janeiro de 2001. Anexo 07: Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis. Ministério de Agricultura e do Abastecimento. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 23 jan. 2001.

BUENO, C. Z. Influência do tipo de estratégia de reforço das propriedades mecânicas nas características de membranas de quitosana e alginato projetadas para o recobrimento de lesões de pele. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas,. *Dissertação (Mestrado)*. 2010

- BURIOL, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 2, 296-302, 2009
- CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
- CAMPOS, A.C.L., BRANCO, A.B., GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. *ABCD Arq. Cir. Dig.*, 20(1), p.51-58, 2007.
- CANAVEROLO, S. V. *Ciência dos Polímeros* 2º Ed. Artliber 2007
- CARNEIRO. J; JUNQUEIRA. L. C. *Biologia Celular e Molecular* - 9ª Ed. Guanabara Koogan, 2012.
- CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512- 1516, 2007
- CATANZANO J B O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing—A Review, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 104, Issue 11, Pages 3653-3680. 2015
- CHEN, J.; ZHANG, L. C.; XING, Y. M.; WANG, Y. Q.; XING, X. K. Diversity and Taxonomy of Endophytic Xylariaceae Fungi from Medicinal Plants of *Dendrobium* (Orchidaceae). *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.
- CHEN, P-H.; KUO, T-Y.; KUO, J-Y.; TSENG, Y-PO.; WANG, D-M.; LAI, J-Y.; HSIEH, H-J. Novel chitosan–pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p.1236-1242, 2010.
- CICCO N, LANORTE M, PARAGGIO M, VIGGIANO M. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* 91: 107-110. 2009.
- CIULIK, C.B., Modificação química de celulose para utilização em mistura com polietileno de alta densidade, dissertação de mestardo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 70 p. 2010.
- COIMBRA, P.; et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v, 48, p. 112-118, 2011.
- CUNHA AP. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. *ESALQ*. 1-6. 2. 2011
- DALEPRANE J.B, ABDALLA D.S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions, Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume, Article ID 175135, 8 pages. 2013

DALLAN, P. “Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele”. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química), Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 212p. 2005

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PACHECO, E., LIMA, I.B., ABREU, J.A. e PARK, Y.K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. Mensagem Doce, v. 89, p. 2- 15, 2006.

DAVIDE CAMPOCCIA, LUCIO MONTANARO, CARLA RENATA ARCIOLA, A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces, Biomaterials 34 8533 e 8554, 2013.

DEJIAN HUANG, BOXIN OU, AND RONALD L. PRIOR. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, J. Agric. Food Chem., 53, 1841–1856 1841. 2005.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo; Brasil Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 28, n.3, p. 241- 249, 2008

FEDERICA PELLATI A, GIULIA ORLANDINI, DIEGO PINETTI, STEFANIA BENVENUTI; HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 55 934–948. 2011

FERNANDES A.J; Atividade antimicrobiana de própolis de Apis mellifera obtidas em três regiões do Brasil Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, jan-fev, 2006

FIGUEIREDO, L; OLIVEIRA, F. F. R. A Europa das Descobertas e das Invenções Científicas, Ciência Viva, Lisboa, 2003.

FRANCO, S.L., BRUSCHI, M.L., MOURA,, L.P.P; BUENO, J.H.P. Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. Revista Brasileira de Farmacognosia 9/10. 2000.

FRANK E. K, GUY T. C. The evolving role of natural products in drug discovery, nature reviews | drug discovery, volume 4. 2005

FRANKE, M. Biomateriais. Universidade Federal de Santa Catarina (ed.), Florianópolis, 2003.

FREDEL, M.C., BARRA, G. Tópicos especiais: biomateriais, Universidade Federal de São Carlos (ed.), São Carlos, 2004.

FROZZA, C.O. et al. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. Food Chem Toxicol 63, 195-204. 13. 2014

FUNARI, C. S.; FERRO, V. Análise de Própolis. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, p. 171-178, 2006.

GARCIA, J.; et al. Produção de própolis em colônias de Apis mellifera africanizadas pelas técnicas convencional de raspagem e coletor de própolis inteligente. Maringá, PR. Anuário 1999/2000

GEARY, T.G.; CHIBALE, K.; ABEGAZ, B.; MAROBELA, K.A.; UBALIJORO, E. A new approach for anthelmintic discovery for humans. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 5, p. 176-181, 2012.

GEOFFREY C. G, SABINE W , YANN B & MICHAEL T. L. Wound repair and regeneration *NATURE*|Vol 453|15 May 2008

GHISALBERTI, E. L.; Propolis: A Review, *Bee World*, 60:2, 59-84, 1979.

GILBERT, B; FERREIRA, J. L. P; ALMEIDA, M. B. Z. S; CARVALHO, E. S.; CASCON, V.; ROCHA, L. M. The official use of medicinal plants in public health. *Ciência e Cultura*, v. 49, n. 5/6, p. 339-344, 1997.

GODFREY CHI-FUNG CHAN & KA-WAI CHEUNG & DANIEL MAN-YUEN SZE, The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis, *The Immunomodulatory and Anticancer Properties of Propolis, Clinic Rev Allerg Immunol* 44:262–273. 2013

GOMES T., et al. Caracterização das lesões crônicas e os fatores associados em moradores de um território de saúde em Vitória, Espírito Santo, 13(1): 52-57 *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*. 2011.

GORDON M. CRAGG, DAVID J. NEWMAN, AND KENNETH M. SNADER. Natural Products in Drug Discovery and Development, *J. Nat. Prod.* 1997, 60, 52-60.

GUEST, J. F., AYOUB, N., MCILWRAITH, T., UCHEGBU, I., GERRISH, A., WEIDLICH, D., VOWDEN, P. Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ open*, 5 (12), 2015.

GURTNER, G.C. et al. Wound repair and regeneration. *Nature*, v.453, n.15, p.314-321, 2008.

HAMMAN, J.H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

HAVSTEEN B.H. / *Pharmacology & Therapeutics* 96, 67–202. 2002.

HEYER K, HERBERGER K, PROTZ K, GLAESKE G, AUGUSTIN M. Epidemiology of chronic wounds in Germany: analysis of statutory health insurance data. *Wound Repair Regen.* Mar;24(2):434-42. 2016

HOLZAPFEL B.M et al. A How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view (B.M. Holzapfel et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 581–603). 2013.

HU F, HEPBURN HR, LI Y, CHEN M, RADLOFF SE, DAYA S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* 100: 276-283. 2005

- HUBBELL, J. A. Bioactive biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:123–129. 1999.
- IURK, L. K. et al. Evidências no tratamento de queimaduras. *Rev. Bras. Queimaduras*, São Paulo, v.9, n.3, 2010.
- JINDAL, M.; KUMAR, V.; RANA, V.; TIWARY, A.K. Aegle marmelos fruit pectin for food and pharmaceuticals: Physico-chemical, rheological and functional performance. *Carbohydrate Polymers*, v. 93, p. 386- 394, 2013.
- KENION, M. M.; ANDERSON, R, J. Maltodextrins and low-dextrose-equivalence corn syrup solids:production and technology for the flavor industry.IN REINECCIUS, G.A; RISCH, S. J. Flavor encapsulation.ACS Symposium series, American Chemical Society, Washington,DC: V 370,p.7-11, 1988.
- KHOSHGOZARAN. A, S., Azizi, M. H., HAMIDY, Z., BAGHERIPOOR-FALLAH, N. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2058–2062. 2012.
- KUREK, M.; DESCOURS, E.; GALIC, K.; VOILLEY, A.; DEBEAUFORT, F. How composition and process parameters affect volatile compounds in biopolymers films. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 646-656. 2011.
- LAM, M.; PAULSEN, P.; CORREDIG, M. Interactions of Soy Protein Fractions with HighMethoxyl Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 4726-4735, 2008.
- LASKAR, R. A., SK, I., ROY, N., & BEGUM, N. A. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, 122(1), 233-237. 2010.
- LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRØNDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2533-2541, 2007
- LEONARD JURD and T. A. GEISSMAN. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds, Received June 11, 1956.
- LIMA R.G.J et al. Desenvolvimento e caracterização de filmes à base de Poli(3-hidroxibutirato) aditivado com ZnOnano. *Original Article Campinas*, v. 19, e2015082, 2016
- LIMA, A O N. Produção de própolis por abelha melífera africanizada (*Apis mellifera* L.) na caatinga do médio jaguaribe cearense. 2012. 92 f. Tese (doutorado em zootecnia)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2012.
- LOOTENS, D. et al. V. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*, v. 17, p. 237-244, 2003.

LOPEZ, A.M.Q, et al. “Normas de produção da Própolis Vermelha de Alagoas”, Mimeo, Documento enviado ao INPI para solicitação da Indicação Geográfica, modalidade Denominação de Origem - Mista, Maceió, 2011.

LÓPEZ, B. G.-C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. Food Chemistry, v. 146, n. 0, p. 174-180, 2014.

LUSTOSA S. R., Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 18(3): 447-454, Jul./Set. 2008

LUSTOSA SR, GALINDO AB, NUNES LCC, RANDAU KP, ROLIM NETO PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Rev Bras Farmacogn 18: 447-454; 2008

LUSTOSA SR, GALINDO AB, NUNES LCC, RANDAU KP, ROLIM NETO PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Rev Bras Farmacogn 18: 447-454, 2008.

MACHADO, G. O. Preparação e Caracterização de CMC e CMC graftizada São Carlos. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo, 2000.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C. & VEIGA, V.E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova 23: 429-438, 2002.

MALAGUTTI, W.; KAKIHARA, C. T. Curativo, estomias e dermatologia: uma abordagem multiprofissional. São Paulo: Martinari, 2010.

MANDELBAUM S.H. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I, An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 78(4):393-410, jul./ago. 2003.

MARCIO R.B, et al. Popular knowledge and practices regarding healthcare using medicinal plants. Original Article - 363 - Text Context Nursing, Florianópolis, Abr-Jun; 21(2): 363-70. 2012

MARÇO P H; POPPI R J; SCARMINIO I S; Analytical procedures for identifying anthocyanins in natural extracts; Quím. Nova vol.31 no.5 São Paulo 2008

MARCUCCI MC. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. Revista Fitos, 1:36-45. 2008.

MARCUCCI MC. Própolis: a chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie 26: 83-99. 1995.

MAURSTAD, A., T. TRINE DALE & P. A. BJØRN.. You Wouldn't Spawn in a Septic Tank, Would You? Human Ecology, 35: 601-610. 2007.

MELO AAM, MATSUDA AH, ALMEIDA-MURADIAN LB. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. Rev Inst AdolfoLutz. São Paulo, 71(3):540-8. 2012

MENDONÇA R.J. & COUTINHO-NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol.* 84(3):257-262. 2009.

MENEZES H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq Inst Biol* 72: 405-411. 2005

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burn dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 463, p. 127-136, 2014.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry*, v. 103, p. 729-733, 2007.

MOREIRA, L; et al - Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): a first approach. *Food and Chemical Toxicology*. ISSN 0278-6915. 49:2, p. 520-526. 2011.

MORSY, A. S.; ABDALLA, A. L.; SOLTAN, Y. A. et al. Effect of brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. *Trop. Anim. Health Prod.* v.45, n.7, p.1609-1618, 2013.

MOȚ, A. C.; SILAGHI-DUMITRESCU, R.; SÂRBU, C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 24, n. 4-5, p. 516-522, 2011.

NINAN, N. et al. Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 877-885, 2013.

NISHIJIMA, T. et al. Chronic ingestion of apple pectin can enhance the absorption of quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 2583-2587, 2009

NUNAN R, HARDING KG, MARTIN P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis Model Mech.*;7(11):1205-13. 2014

NUNES, C. et al. Occurrence of cellobiose residues directly linked to galacturonic acid in pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, p. 620-626, 2012.

ORYAN A, et al. *Biomed Pharmacother*. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. 2018

PARK, J.B. *Biomaterials Science and Engineering*, Plenum New York. 1984.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. & ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físicoquímicas e propriedades biológicas. 2000.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. & ALENCAR, S.M.. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físicoquímicas e propriedades biológicas. 2000.

- PAUL, W.; SHARMA, C.P. "Chitosan and alginate wound dressings: a short review". Trends in Biomaterials & Artificial Organs, v.18, p.18- 23, 2004
- PEREIRA, A.S, SEIXAS, F.R, & AQUINO NETO, F.R., Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. Química Nova. 25, 321-326. 2002
- PEREIRA, F. M; VILELA, S. L. O. Estudo da cadeia produtiva do mel no estado de Alagoas. SEBRAE.. 65p. 2003
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. Phytochemistry, v.56, p.237-243, 2001.
- RASKIN, L. et al. Plants and human health in the twentyfirst century. TRENDS in Biotechnology, v.20, n.12, p.522- 31, 2002.
- RATNER, B.D., HOFFMAN, A.S SHOEN. LEMONS, J (Eds),. Biomaterials Science: An Introduction to materials in Medicine, Third ed. Elsevier, Inc., Amsterdam. 2013.
- REED, K.B.; MAJEWICZ, A.; KALLEM, V.; ALTEROVITZ, R.; GOLDBERG, K.; COWAN, N.J.; OKAMURA, A.M.. Robot-Assisted Needle Steering. Robotics & Automation Magazine, IEEE, 18(4):35-46. 2011
- RIBEIRO. T. et al. Learning delayed influences of biological systems. ORIGINAL RESEARCH ARTICLE published: 16 January 2015
- RODRIGUES, A. P.; SANCHEZ, E. M. S.; COSTA, A. C.; MORAES, A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. Journal of Applied Polymer Science, v. 109, p. 2703-2710, 2008.
- SALATINO, A.; FERNANDES-SILVA, C. C.; RIGHI, A. A.; SALATINO, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. Royal Society Chemistry, v. 28, n. 5, p. 925-936, 2011.
- SANKALIA, M. G.; MASHRU, R. C.; SANKALIA, J. M.; SUTARIYA, V. B. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 65, p. 215–232, 2007
- SFORCIN J.M., V. BANKOVA; Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?, Journal of Ethnopharmacology 133 253–260. 2011
- SHAHIDI, H, XIAO-QING. Em Capsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, V. 33, n 6, p. 501-547, 1993.
- SHUAI HUANG et al, Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. Molecules, 19, 19610-19632; 2014

SILVA, A.F. Própolis: Caracterização físico-química atividade antimicrobiana e antioxidante – Viçosa, MG,. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa. 2009

SITUM, M. “ Inability of gearing-ratio as predictor for earling warning systems,” Business Systems Research, Vol.5, nº2, pp. 23-45. 2014.

SMANIOTTO P.H.S, FERREIRA M.C, ISAAC. C, GALLI. R, Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas Rev Bras Cir Plást.;27(4):623-6. 2012

SOUSA CM, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim Nova 30: 351-355. 2007.

SOUSA, L.C.F.S.; SOUSA, J, E. S.; SOUSA, J. S.; WANDERLAY, J. A. C.; BORGES, M. G, B. Ethnobotany knowledge of public school students in the city of Pombal-PB. Revista Verde, v. 6, p. 139- 145, 2011.

SOUZA, E. A. et al. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. Archivos de Zootecnia, v. 59, n. 228, p. 571-576, 2010

TANODEKAEW, S.; PRASITSILP, M.; SWASDISON, S.; THAVORNYUTIKARN, B.; POTHSREE, T.; PATEEPASEN, R. Preparation of acrylic grafted chitin for wound dressing application. Biomaterials, v. 25, p. 1453–1460, 2004

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K.; HANDA, A.K. Chemistry and Uses of Pectin – a Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 37, p. 47-73, 1997.

THARANATHAN R.N., PRASHANTH K.V. H. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan overview. Trends in Food Science & Technology 18, 117- 131, 2007.

TORETI, V.C., SATO, H.H., PASTORE, G.M., PARK, Y.K.,. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. Evid.-Based Complement. Alternat. Med. 2013

TRUSHEVA B, POPOVA M, BANKOVA V, SIMOVA S, MARCUCCI MC, MIORIN PL, PASIN FR, TSVETKOVA I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. e CAM 3: 249-254. 2006

UYGUN, B.E., et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix, Nature Medicine volume16, pages 814–820. 2010.

VALENCIA-BASTO, C. Cicatrización: proceso de reparación tisular. Aproximaciones terapéuticas. Investig. andina, Pereira, v. 12, n. 20, Apr/ 2010

VALENTE, M.J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radicalinduced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. Food and Chemical Toxicology, New York, v.49, n.1, p.86-92, jan., 2011.

VANHAELEN, M., & VANHAELEN FASTRÉ, R. Propolis. I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. *Journal de pharmacie de Belgique*, 34(5), 253-259. 1979.

VENANZI, D.C., Filmes finos auto-organizados de polissacarídeos de carboximetilcelulose amido catiônico e quitosana: Fabricação de folmes e incorporação de corantes iônicos. Relatório de iniciação Científica, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 82p, 2008.

VOLPI N, BERGONZINI G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 42: 354-361. 2006

WANG, Z. et al. - Rheological behavior of raw natural rubber coagulated by microorganisms. *Polímeros*, vol. 24, n. 2, p. 143-148, 2014.

WIEGAND C., HIPLER U. C., *Macromol. Symp.* 294-II (2010).

WIEGAND, C.; HIPLER, U. Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. *Macromolecular Symposia*, v. 294, n 2, p. 1–13, 2010.

WOISKY, R.G. do Rio. Métodos de controle químico de amostras de própolis. São Paulo.. 74 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. 1996.

XAVIER. J.A. Avaliação da capacidade antioxidante e perfil químico de própolis do Nordeste da Bahia,.Dissertação Universidade Federal de Alagoas. 2015

YUDANOVA. T. N. AND RESHETOV I. V. Drug synthesis methods and manufacturing technology modern wound dressings: making and properties. ii. wound dressings containing immobilized proteolytic enzymes (A REVIEW) Vol. 40, No. 8, pp. 24 – 28, August, 2006.