

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

Isabella Salgado Gonçalves

**HIDROGÉIS DE BIOCELULOSE CONTENDO PRÓPOLIS ASSOCIADOS À
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA VISANDO APLICAÇÃO EM TRATAMENTO DE
FERIDAS**

Araraquara, SP

2021

Isabella Salgado Gonçalves

**HIDROGÉIS DE BIOCELULOSE CONTENDO PRÓPOLIS ASSOCIADOS À
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA VISANDO APLICAÇÃO EM TRATAMENTO DE
FERIDAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Co-orientador: Prof. Dr. Sebastião Pratavieira

Araraquara, SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

G626h Gonçalves, Isabella Salgado

Hidrogéis de biocelulose contendo própolis associados à inativação fotodinâmica visando aplicação no tratamento de feridas/Isabella Salgado Gonçalves. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021. 98f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

1. Feridas. 2. Biocelulose. 3. Própolis. 4. Inativação fotodinâmica.
I. Título.

CDU 57.089

ISABELLA SALGADO GONÇALVES

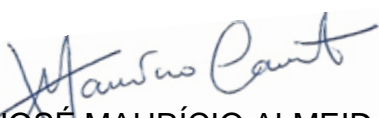
Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 17 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD(Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. JOSÉ MAURÍCIO ALMEIDA CAIUT
Professor Doutor da Universidade de São Paulo - USP



Drª. ANDRESA APARECIDA BERRETTA
Pesquisadora junto à empresa Apis Flora Ltda de Ribeirão Preto/SP

Dedico este trabalho à minha avó, Maria Augusta, que é minha maior torcida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que se fizeram presentes e de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho;

À minha família, por todo o suporte, amor e amparo que sempre me concederam, possibilitando e tornando melhor o caminho trilhado durante o desenvolvimento deste trabalho, e auxiliando no meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço por sempre estarem ao meu lado e apoiarem as minhas escolhas.

Aos amigos, que sempre estiveram presentes para amortecer as quedas durante a jornada e torná-la mais alegre;

À amizade especial criada durante o mestrado, da Dra. Lais Roncalho de Lima, que além de me ensinar a preparar os hidrogéis para este trabalho, esteve sempre ao meu lado, me incentivando em todas as dificuldades e me ajudando com muito carinho;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hernane da Silva Barud, pela excelente orientação, por todo o conhecimento transmitido e por todas as oportunidades proporcionadas, principalmente a de concretizar este trabalho;

Ao Laboratório BioPolMat e colegas com os quais partilhei o dia a dia, e aos laboratórios e funcionários da UNIARA.

Ao meu co-orientador, Prof. Sebastião Pratavieira, por ter aberto as portas do Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, (IFSC-USP), ao qual também agradeço; e à Thaila Quatrini Corrêa, pelo auxílio e gentileza;

À Dra. Fernanda Mansano Carbinatto, por me acompanhar desde o início desta jornada, sempre me encorajando e me ajudando com muita paciência.

À empresa Apis Flora pela parceria estabelecida, e à Dra. Andresa Berretta à Nathaly Alcazar Amorim, por toda a ajuda, paciência e gentileza;

Aos órgãos de fomento CEPOF, CNPq, FAPESP e FUNDUNESP pelo suporte financeiro concedido.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

RESUMO

O tratamento de feridas ainda é um desafio tanto para os profissionais de saúde quanto para os pesquisadores, que buscam métodos mais eficientes que auxiliem a cicatrização e também sejam capazes de tratar ou prevenir infecções. Visto isso, foram desenvolvidos hidrogéis de biocelulose contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) com objetivo de produzir uma formulação tópica para ser utilizada como biocurativo com propriedades cicatrizantes e antimicrobianas, e que também seja adequado para uso em inativação fotodinâmica. Os hidrogéis foram produzidos a partir da trituração de membranas de celulose produzidas em cultivo de *Komagataeibacter rhaeticus*, seguido da incorporação de EPP-AF®. As formulações foram caracterizadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) e análises térmicas, as quais mostraram a devida incorporação da própolis na matriz de biocelulose, sem alterar suas propriedades. Ensaio de reologia demonstraram o comportamento pseudoplástico e tixotrópico das formulações, adequado para esta finalidade. As formulações não apresentaram mutagenicidade. Foi quantificada a presença de biomarcadores da própolis nos hidrogéis, bem como sua liberação através do tempo, onde foram liberados das formulações por mais de 20 h. Novas formulações foram preparadas acrescentado azul de metileno (AM) para estudos com aplicação de luz e as caracterizações espectroscópicas de absorção na região do UV-Vis e emissão de fluorescência confirmaram a interação a presença de AM e própolis nos hidrogéis. Ensaio de microdiluição e difusão em ágar mostraram a eficiência das formulações contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, sugerindo grande potencial dos hidrogéis para aplicação em inativação fotodinâmica visando o tratamento de feridas.

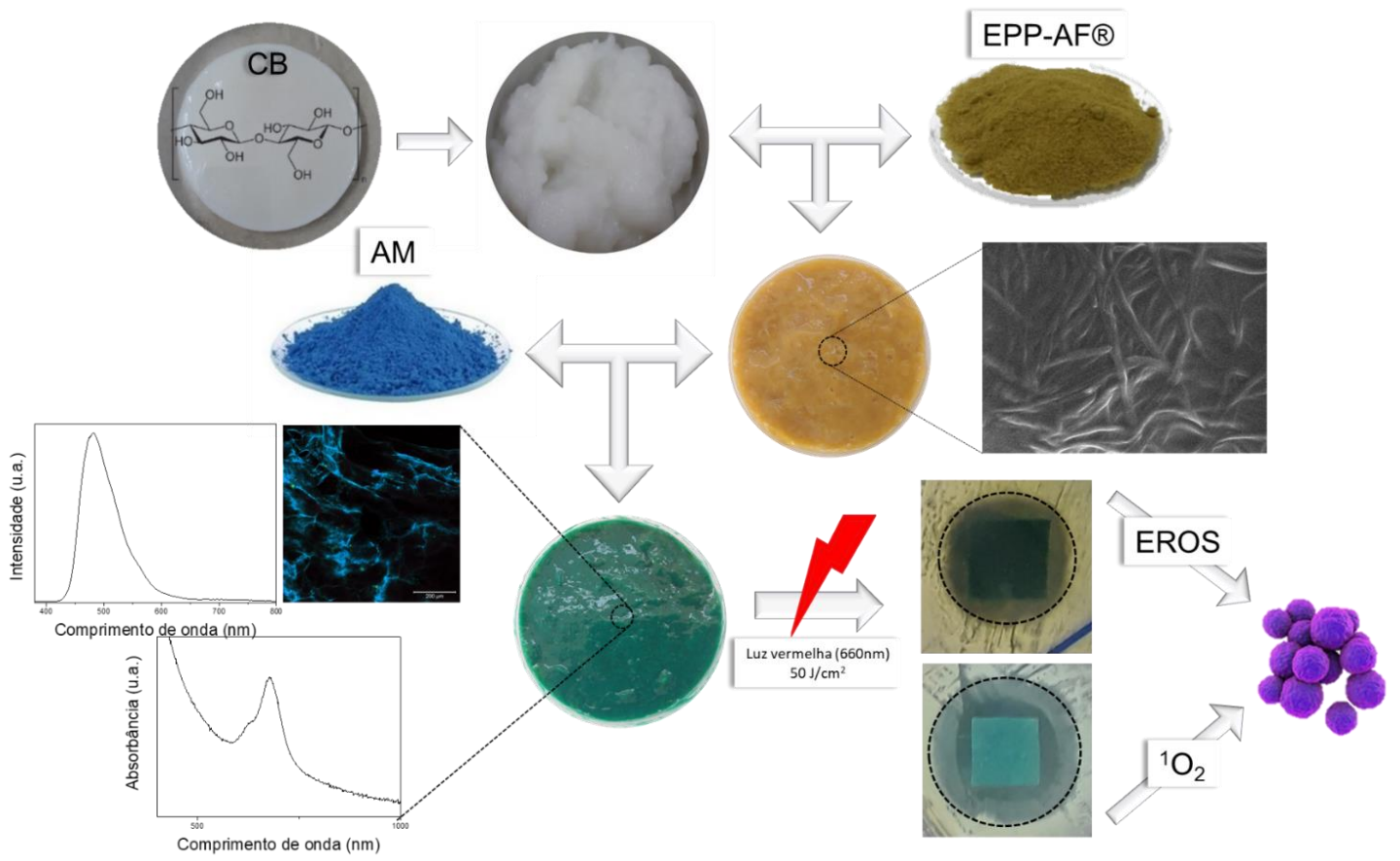
Palavras-chave: feridas; biocelulose; própolis; inativação fotodinâmica

ABSTRACT

Wound treatment is still a challenge for both healthcare professionals and researchers, who are looking for more efficient methods that aid healing and which can also treat or prevent infections. Therefore, biocellulose hydrogels were developed containing standardized propolis extract (EPP-AF®) in order to produce a topical formulation to be used as a biocurative with healing and antimicrobial properties, and which might be also suitable for use in photodynamic inactivation (PDI). Hydrogels were produced from the grinded cellulose membranes, produced by the cultivation of *Komagataeibacter rhaeticus*, followed by the incorporation of EPP-AF®. The formulations were characterized by scanning electron microscopy (SEM), vibrational spectroscopy in the infrared region (FTIR) and thermal analysis, which showed the proper incorporation of propolis in the biocellulose matrix, without changing its properties. Rheology studies demonstrated the pseudoplastic and thixotropic behavior of formulations, suitable for this purpose. Furthermore, they did not present mutagenicity. The presence of propolis biomarkers in hydrogels was quantified, as well as their release over time, where they were released from the formulations for more than 20 h. New formulations were prepared by adding methylene blue (AM) for studies with light application and spectroscopic characterizations, as UV-Vis and fluorescence emission, confirmed the interaction of AM and propolis in hydrogels matrix. Microdilution and diffusion on agar tests showed the efficiency of the formulations against the growth of *Staphylococcus aureus*, suggesting great potential of the hydrogels for application in photodynamic inactivation aiming at the treatment of wounds.

Keywords: wounds; biocellulose; propolis; photodynamic inactivation

RESUMO GRÁFICO



APRESENTAÇÃO

A biocelulose, conhecida também como celulose bacteriana (CB), é obtida principalmente através do cultivo de bactérias do gênero *Komagataeibacter*, e já é utilizada no tratamento de feridas na forma de membrana e hidrogel devido à sua grande eficiência no auxílio do processo de cicatrização. No primeiro capítulo desta dissertação estão contidas uma revisão bibliográfica com dados gerais sobre feridas, cicatrização e tratamentos, abrangendo a biocelulose e a produção e caracterização de hidrogéis de CB contendo EPP-AF®. A própolis, além de ser anti-inflamatória e cicatrizante, acrescenta às formulações atividade antimicrobiana, tornando-as capaz de inibir o crescimento ou matar microrganismos.

O segundo capítulo refere-se à inativação fotodinâmica, técnica segura e eficaz para o tratamento e descontaminação de feridas, e nele estão contidos uma revisão bibliográfica sobre o tema, assim como a produção e caracterizações espectroscópicas dos hidrogéis de biocelulose contendo própolis juntamente com o agente fotossensibilizante azul de metileno. Neste capítulo também estão contidos os resultados de observação por microscopia confocal de fluorescência e ensaios antimicrobianos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Etapas do processo de cicatrização de feridas.	24
Figura 2. Estrutura química da celulose bacteriana mostrando a união das moléculas de glicose através de ligações glicosídicas β -1,4 entre o carbono 1 de uma molécula e o carbono 4 da outra.	26
Figura 3. Composição geral da própolis em sua forma bruta.	29
Figura 4. Representação esquemática dos componentes da célula de Franz.	38
Figura 5. Aspecto macroscópico das formulações liofilizadas. HB: hidrogel base de Natrosol®; HCB: hidrogel de CB; HCB/EPP1: hidrogel CB + 1,2% EPP-AF®; HCB/EPP2: hidrogel CB + 2,4% EPP-AF®; HCB/EPP3: hidrogel CB + 3,6% EPP-AF®.	42
Figura 6. Micrografias dos hidrogéis e da membrana de CB liofilizados.	43
Figura 7. Curvas de TG, DTG e DSC de CB, HCB, HB e EPP-AF®.	44
Figura 8. Curvas de TG, DTG e DSC de HCB/EPP1, HCB/EPP2 e HCB/EPP3.	46
Figura 9. Espectros vibracionais no infravermelho de CB, HB, EPP-AF®, HCB, HCB/EPP1, HCB/EPP2 e HCB/EPP3.	47
Figura 10. Curvas de fluxo ascendentes e descendentes da tensão de cisalhamento e viscosidade por taxa de cisalhamento.	49
Figura 11. Viscosidade de cada formulação produzida, demonstrando aumento com a presença de CB e aumento proporcional conforme a porcentagem de própolis incorporada.	50
Figura 12. Perfil cromatográfico dos hidrogéis, em que os picos enumerados são correspondentes à presença de: 1-ácido <i>p</i> -cumárico; 2-Artepin C; 3-bacarina.	51
Figura 13. Perfis de liberação de ácido <i>p</i> -cumárico e Artepin C de cada formulação em um período de 72 h.	52
Figura 14. Mecanismo de ação da PDI sendo aplicada à inativação de vírus, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e parasitas.	59
Figura 15. Estrutura química do azul de metileno.	61
Figura 16. Poços contendo inóculo de <i>S. aureus</i> , suspenso em PBS, homogeneizado nas formulações a serem testadas no escuro e na luz, sendo A: HB; B: HCB; C: HCB/EPP1; D: HCB/AM1; E: HCB/ AM2; F: HCB/EPP1/AM1 e G: HCB/EPP1/AM2.	66

Figura 17. BioTable em funcionamento, com irradiação de luz vermelha (660 nm – 50 J/cm ²).	66
Figura 18. Aspecto macroscópico das formulações liofilizadas do grupo HB e HCB.	69
Figura 19. Espectros de absorção na região do UV-Vis dos grupos HB (esquerda) e HCB (direita).....	70
Figura 20. Espectros de emissão de fluorescência dos grupos HB (esquerda) e HCB (direita).	72
Figura 21. Imagens de microscopia confocal de fluorescência das formulações do grupo HB.	73
Figura 22. Imagens de microscopia confocal de fluorescência das formulações do grupo HCB.....	74
Figura 23. Inativação de <i>S. aureus</i> , em Log UFC/mL, resultado de experimento sem exposição à luz - barras pretas - e após a irradiação de LED vermelho com dose de luz de 50 J/cm ² (660 nm) – barras brancas.	75
Figura 24. Efeito antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> das bases das formulações, Natrosol® (HB) e biocelulose (HCB), em experimentos no escuro (à esquerda), e após PDI com 50 J/cm ² de dose de luz em 660 nm, à direita.	79
Figura 25. Efeito antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> das bases das formulações, Natrosol® (HB) e biocelulose (HCB), em experimentos no escuro (à esquerda), e após PDI com 50 J/cm ² de dose de luz em 660 nm, à direita.	79
Figura 26. Efeito antimicrobiano contra <i>S. aureus</i> das formulações à base de CB contendo 1,2 % de EPP-AF® (HCB/EPP1), 0,01 % de AM (HCB/AM1) e 0,1 % de AM (HCB/AM2) em experimentos no escuro (à esquerda), e após PDI com 50 J/cm ² de dose de luz em 660 nm, à direita	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes utilizados no preparo das formulações.....	35
Tabela 2. Composição química dos marcadores de EPP-AF® contidos nos hidrogéis.	51
Tabela 3. Índice de mutagenicidade das formulações.	55
Tabela 4. Formulações do grupo HB.....	63
Tabela 5. Formulações do grupo HCB.	64
Tabela 6. Valores médios dos halos de inibição de <i>S. aureus</i> pelas formulações, em experimentos no escuro e no claro (660 nm).	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Azul de Metileno
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CB	Celulose Bacteriana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DTG	Derivada da TG
EPP-AF®	Extrato Padronizado de Própolis Apis Flora
FS	Fotossensibilizante
FTIR	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HS	Hestrin e Schramm
IL-6	Interleucina 6
IM	Índice de Mutagenicidade
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
M	Número de Revertentes por Placa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDI	<i>Photodynamic Inactivation</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
TG	Termogravimetria
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>

UFC Unidades Formadoras de Colônias

UV-Vis Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

Capítulo 1	22
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Feridas.....	23
1.2. Celulose bacteriana.....	25
1.3. Própolis.....	28
2. OBJETIVOS	33
2.1. Objetivo Geral.....	33
2.2. Objetivos Específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1. Desenvolvimento das formulações em forma de hidrogel	34
3.1.1. Produção de celulose bacteriana	34
3.1.2. Purificação da CB	34
3.1.3. Obtenção da polpa de biocelulose	35
3.1.4. Produção das formulações	35
3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
3.3. Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	36
3.4. Análise Térmica.....	36
3.5. Reologia.....	37
3.6. Perfil Cromatográfico.....	37
3.7. Estudo de liberação.....	38
3.8. Ensaio de mutagenicidade – Teste de Ames.....	39

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
4.1. Produção dos hidrogéis.....	42
4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
4.3. Análise térmica.....	44
4.4. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	47
4.5. Reologia.....	48
4.6. Perfil Cromatográfico.....	50
4.7. Ensaio de Liberação.....	52
4.8. Ensaio de Mutagenicidade – Teste de Ames.....	54
5. CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 1	56
Capítulo 2	57
1. INTRODUÇÃO	58
1.2. Terapia Fotodinâmica/ Inativação Fotodinâmica (PDT/PDI).....	58
2. OBJETIVOS	62
2.1. Objetivo Geral.....	62
2.2. Objetivos Específicos.....	62
3. METODOLOGIA	63
3.1. Produção de hidrogéis.....	63
3.2. Caracterizações Espectroscópicas.....	64
3.2.1. Espectroscopia UV-Vis.....	64
3.2.2. Espectroscopia de fluorescência.....	64
3.3. Microscopia Confocal de Fluorescência.....	65

3.4.	Ensaio antimicrobiano	65
3.4.1.	Preparo do microrganismo	65
3.4.2.	Microdiluição	65
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	69
4.1.	Aspecto macroscópico das formulações contendo AM e EPP-AF®.....	69
4.2.	Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis.....	70
4.3.	Espectroscopia de fluorescência.....	71
4.4.	Microscopia Confocal de Fluorescência.....	73
4.5.	Ensaio antimicrobiano	74
4.5.1.	Microdiluição	74
4.5.1.	Difusão em ágar.....	76
5.	CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 2	81
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	84

Capítulo 1

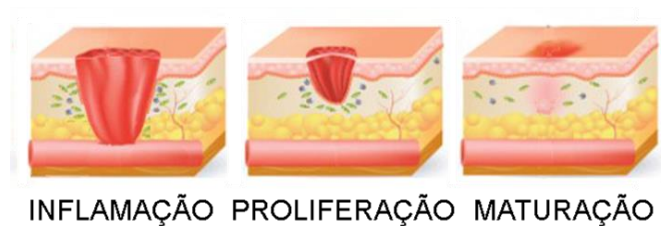
1. INTRODUÇÃO

1.1. Feridas

Feridas são lesões que interrompem a continuidade de um ou mais tecidos corpóreos, prejudicando a integridade de sua estrutura anatômica e funcional (BOATENG e CATANZANO, 2015). Essas lesões podem ter origem em traumas mecânicos, térmicos, químicos ou biológicos, como feridas cirúrgicas, lacerações, perfurações, contusões, queimaduras; ou podem ser decorrentes de alguma infecção ou doença adjacente, como diabetes *mellitus*, por exemplo (TAZIMA *et al.*, 2008; AQUINO-JÚNIOR *et al.*, 2019). Por ser mais exposta a possíveis danos externos, a pele é o órgão mais acometido pelas feridas, porém de acordo com o tipo e complexidade da lesão, elas podem acometer o tecido subcutâneo, músculos, tendões, nervos, vasos, podendo atingir até os ossos (NITSCHKE, 2010; BOATENG e CATANZANO, 2015).

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico influenciado por fatores locais e sistêmicos, que envolve reações em cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos interagindo coordenadamente para a promover o reparo tecidual (CAMPOS *et al.*, 2007). Este processo constitui-se basicamente de três fases (Fig. 1), sendo: fase de inflamação, como primeiro mecanismo de defesa e reparação, que se inicia com a hemostasia e envolve a liberação de citocinas para quimiotaxia de linfócitos; fase de proliferação, em que ocorre angiogênese, migração de fibroblastos, síntese de colágeno e de matriz extracelular, e proliferação de células epiteliais; e a última fase do processo, fase de maturação, abrange a contração da ferida, epitelização e produção e remodelamento de fibras de colágeno, que formam a cicatriz e conferem maior resistência ao tecido formado (TAZIMA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2018).

Figura 1. Etapas do processo de cicatrização de feridas.



Fonte: Adaptado de Bioderms (2018).

As feridas podem ser classificadas em agudas ou crônicas, sendo as crônicas aquelas que não seguem a ordem das etapas do processo de cicatrização e não têm sua integridade anatômica e funcional recuperada dentro de um período de três meses (LAUREANO e RODRIGUES, 2011; AQUINO-JÚNIOR *et al.*, 2019). Dentre as feridas crônicas, destacam-se as úlceras por pressão, venosas, arteriais e diabéticas, as quais possuem alta prevalência populacional e geram impacto social e econômico. Os longos períodos de tratamento, infecções persistentes e elevada taxa de reincidência fazem das feridas crônicas um desafio à saúde pública (COELHO *et al.*, 2017; AQUINO-JÚNIOR *et al.*, 2019). O aumento do envelhecimento populacional e da incidência de obesidade e diabetes tipo II intensificam o problema e trazem a necessidade do desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e de menor custo (BOATENG e CATANZANO, 2015).

Uma das principais causas de atraso ou impedimento da cicatrização de feridas, que levam à ocorrência de feridas crônicas, é a infecção por microrganismos, que se dá pelo excesso da proliferação microbiana no local da lesão gerando resposta imune intensa e dano tecidual, dificultando a cura. Além disso, a formação do biofilme bacteriano, presente em 60% a 90% das feridas crônicas, dificulta a penetração dos antimicrobianos, apresentando tolerância e resistência a antibióticos, o que torna o tratamento ainda mais complicado (HEALEY e FREEDMAN, 2006; BRITISH COLUMBIA, 2017; SHEN *et al.*, 2020).

Os principais agentes causadores de infecções em feridas são as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus spp.*; as Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* e *Escherichia coli*; as anaeróbias

do gênero *Clostridium*; fungos, como *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., além de alguns vírus e protozoários (COLLIER, 2004; BOATENG e CATANZANO, 2015). A infecção gera sinais e sintomas locais característicos nas feridas, como secreção purulenta, aumento da dor, eritema e gangrena úmida, e também sinais sistêmicos, como febre, hipotensão e leucocitose. Com a intensificação do quadro infeccioso, podem ocorrer complicações graves, como celulite, osteomielite, bacteremia e septicemia, podendo levar ao óbito. (BOWLER *et al.*, 2001; CUTTING e WHITE, 2005).

Os tratamentos tradicionais disponíveis para feridas infectadas baseiam-se na administração sistêmica ou tópica de agentes antimicrobianos e antissépticos, como compostos à base de prata ou iodo, clorexidina, violeta genciana, metronizadol e sulfadiazina de prata, por exemplo. Estes agentes geralmente são associados a curativos ou coberturas na forma de hidrogéis, hidrofibras, filmes poliméricos, gaze, espumas e alginatos (HEALEY e FREEDMAN, 2006; BOATENG e CATANZANO, 2015; BRITISH COLUMBIA, 2017). Entretanto, limitações no tratamento como a crescente resistência dos microrganismos aos antimicrobianos conhecidos, os preços normalmente elevados e a baixa eficiência de grande parte dos tratamentos disponíveis levam a um aumento nas pesquisas em novas estratégias com mecanismos diferentes e tecnologias mais avançadas (GÜRGEN, 2014; NESI-REIS *et al.*, 2017).

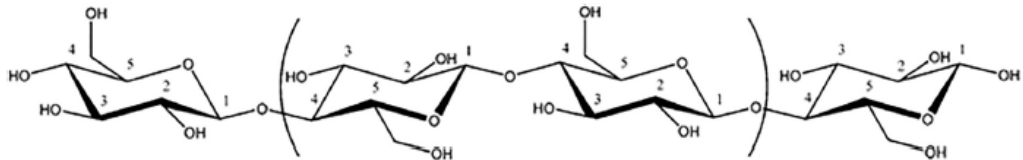
1.2. Celulose bacteriana

A CB, ou biocelulose, é um biopolímero produzido principalmente por bactérias do gênero *Komagataeibacter* spp., que realizam a biossíntese de nanofibras de celulose secretando-as no meio de cultura através de poros presentes em sua membrana celular. Ao serem produzidas, as membranas de celulose captam água do meio e geram como produto uma manta gelatinosa composta de aproximadamente 99% de água, que possui excelentes propriedades mecânicas e químicas (PECORARO *et al.*, 2008; LUSTRI *et al.*, 2015; KLEMM *et al.*, 2018).

A estrutura química da CB é idêntica à da celulose vegetal (Fig. 2), sendo formada por unidades de glicose conectadas por ligações do tipo β -1,4, com a diferença de que a CB não contém substâncias que estão presentes na celulose

vegetal, como a hemicelulose e lignina, apresentando, portanto, elevado grau de pureza (THOMAS *et al.*, 2018; KLEMM *et al.*, 2018).

Figura 2. Estrutura química da celulose bacteriana mostrando a união das moléculas de glicose através de ligações glicosídicas β -1,4 entre o carbono 1 de uma molécula e o carbono 4 da outra.



Fonte: Adaptado de Klemm *et al.* (2018).

Além de ser um polímero natural extremamente puro, a biocelulose apresenta elevada resistência à tração, cristalinidade e estabilidade térmica, possuindo ainda as vantagens de ser biocompatível e biodegradável (KLEMM *et al.*, 2005; CZAJA *et al.*, 2006, KLEMM *et al.*, 2018). A arquitetura de suas nanofibras permite que sejam feitas modificações e incorporação de substâncias em sua matriz para melhorar ou acrescentar propriedades (BARUD, 2010; CACICEDO *et al.*, 2016).

Devido à relevância dessas características, existe uma grande diversidade de aplicações da CB em áreas distintas, como na indústria de alimentos em forma de uma sobremesa denominada “Nata de Coco”, e como um chá chamado de Kombucha, cujas propriedades medicinais estão relatadas em históricos de diferentes culturas. Além do ramo alimentício, a CB ainda atrai olhares da indústria eletrônica, farmacêutica e de cosméticos, setores ambientais e até da moda, onde já é utilizada e conhecida como “couro vegano”. No entanto, sua maior aplicação ainda é na área da saúde (CACICEDO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017).

A biocompatibilidade da CB com o organismo humano torna possível diversas aplicações no ramo da saúde, e apresenta bons resultados sendo utilizada como curativo e substituto temporário de pele, substituto de vasos sanguíneos e nervos, máscaras faciais cosméticas, tratamento de doenças periodontais, lentes de contatos terapêuticas, além de estar sendo amplamente estudada para atuar como *scaffold* na Engenharia de Tecidos e como matriz para liberação controlada de

fármacos (KLEMM *et al.*, 2001; SULAEVA *et al.*, 2015; CACIEDO *et al.*, 2016; TROVATTI *et al.*, 2016; FONTES *et al.*, 2018).

Uma das principais aplicações da biocelulose dentro da área da saúde é no tratamento de feridas, onde já é utilizada como curativo e substituto temporário de pele, comercializados mundialmente por grandes empresas. As vantagens da CB já comprovadas no tratamento de feridas incluem alívio da dor, manutenção da umidade no leito da ferida, absorção do excesso de exsudato, controle da troca de fluidos e proteção contra infecções, acelerando a cura e diminuindo a formação de cicatriz (CZAJA *et al.*, 2006; CZAJA *et al.*, 2007; CHANG e CHEN, 2016).

Devido aos bons resultados em tratamentos de feridas, a CB já é comercializada no Brasil como curativo desde 1990 pela empresa BioFill Produtos Biotecnológicos (Curitiba, Paraná, Brasil) (CZAJA *et al.*, 2006). Sanchavanakit *et al.* (2006) produziram um filme de CB que suportou o crescimento, espalhamento e migração de queratinócitos e, em menor intensidade, de fibroblastos humanos, sugerindo que a membrana de CB pode promover o processo de re-epitelização (SANCHAVANAKIT *et al.*, 2006). Em um estudo clínico, Cavalcanti *et al.* (2017) utilizaram curativos de CB para tratar úlceras venosas, e observaram que eles estimularam o processo de granulação do tecido, induzindo sua remodelação. Além disso, os pacientes tratados com CB puderam ter o uso de analgésicos interrompido previamente por apresentarem diminuição da dor (CAVALCANTI *et al.*, 2017). Lucena *et al.* (2015) também confirmaram a indução de remodelação tecidual e aceleração do processo de cicatrização (LUCENA *et al.*, 2015). Um experimento de tratamentos associados envolvendo membranas de biocelulose, terapia fotodinâmica mediada por curcumina, e laserterapia demonstrou significativa redução da área de úlceras venosas, com cicatrização em um período menor do que o esperado para os tratamentos realizados separadamente (COELHO *et al.*, 2017).

A biocelulose em sua forma natural não apresenta atividade antimicrobiana, portanto, muitos pesquisadores têm se dedicado à pesquisa de métodos para acrescentar esta propriedade aos sistemas de tratamento de feridas baseados neste biopolímero, com objetivo de prevenir ou tratar infecções (SULAEVA *et al.*, 2015). Barud *et al.* (2011) impregnou nanopartículas de prata na membrana de CB, e observou forte atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Modelos de curativos de membranas de biocelulose incorporadas com própolis foram avaliadas *in*

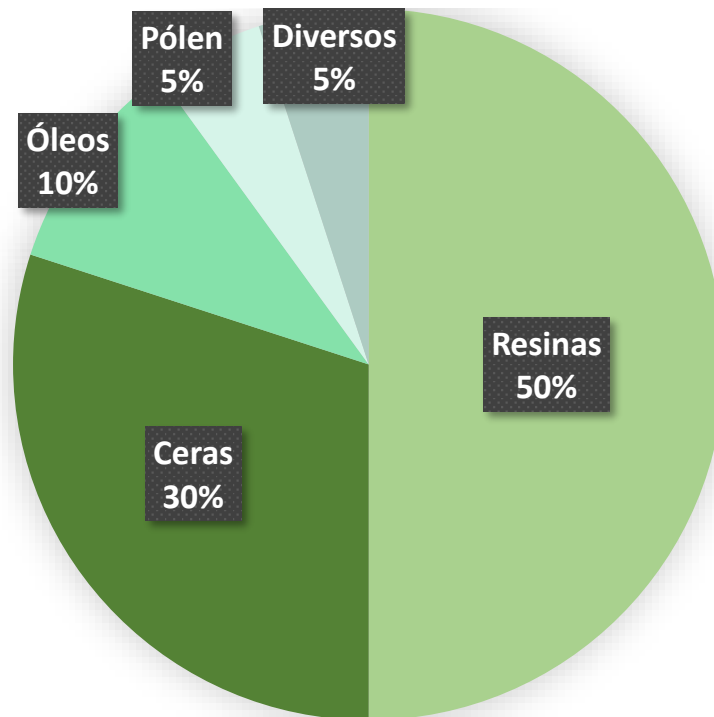
vitro e, como resultado, obteve-se inibição efetiva de todas as cepas de *S. aureus* testadas, inclusive as resistentes à meticilina (MRSA, *Methicillin-resistant S. aureus*) (BARUD *et al.*, 2013).

1.3. Própolis

A própolis é um material resinoso produzido principalmente por abelhas da espécie *Apis mellifera* através da mistura de suas secreções salivares e dos exsudados de cascas de árvores e outros tecidos vegetais. No Brasil, a própolis verde é originária de arbustos da espécie *Baccharis dracunculifolia*, conhecida popularmente como alecrim-do-campo (FUJIMOTO, 2016; VEIGA *et al.*, 2017). Acredita-se que a função da própolis nas colmeias seja mantê-las protegidas de microrganismos patogênicos e oferecer suporte estrutural cobrindo buracos e fissuras, além de regular a temperatura no ambiente interno e protegê-lo de invasores (KUROPATNICK *et al.*, 2013; AHN *et al.*, 2013; CAUICH-KUMUL e CAMPOS, 2019).

As propriedades e composição química da própolis variam de acordo com diversos fatores, como a formação da vegetação local, clima, altitude, composição do solo, época de coleta e espécie de abelha (ORYAN *et al.*, 2018). Já foram encontradas mais de 300 substâncias compondo a própolis, porém, de forma geral, em sua forma bruta ela é constituída por aproximadamente 50 % de resina e bálsamo vegetal, 30 % de ácidos graxos (ceras), 10 % de óleos essenciais e aromáticos, 5 % de pólen e 5 % de compostos orgânicos e inorgânicos diversos (Fig. 3) (SFORCIN, 2016; ORYAN *et al.*, 2018).

Figura 3. Composição geral da própolis em sua forma bruta.



Fonte: Própria.

Os principais constituintes da mistura complexa que compõem a própolis incluem os compostos fenólicos, terpenoides, esteroides, polissacarídeos, ácidos graxos, aminoácidos e micronutrientes, como cálcio, sódio, magnésio, ferro e fósforo, por exemplo (PARK *et al.*, 2002; TORETI *et al.*, 2013; QUINTINO *et al.*, 2020).

As principais substâncias com atividades bioativas da própolis são provenientes dos vegetais e, dentre elas, estão os compostos fenólicos ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico), originado do ácido cinâmico, e seus derivados biossintéticos bacarina, drupanina e Artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), marcador presente em maior quantidade e que caracteriza a própolis verde brasileira (PARK *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2004; SFORCIN E BANKOVA, 2011). Esses compostos estão presentes em concentrações consideráveis em diferentes vegetais e cogumelos e são possivelmente os principais responsáveis por importantes atividades biológicas da própolis, como anti-inflamatória e imunomoduladora (PAULINO *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2012; ALMEIDA-JUNIOR *et al.*, 2020), analgésica (PAULINO *et al.*, 2006; ALMEIDA-JUNIOR *et al.*, 2020), antioxidante

(SIMÕES *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2020), antibacteriana (BERRETTA *et al.*, 2012; SFORCIN, 2016; CAMPOS *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2020), antifúngica (CASTRO *et al.*, 2012; BERRETTA *et al.*, 2013; PINA *et al.*, 2017; BEZERRA *et al.*, 2020), antiviral (AMOROS *et al.*, 1992; PETER *et al.*, 2017) antiulcerogênica e gastroprotetora (BARROS *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2018), antitumoral (BHARGAVA *et al.*, 2018; QUINTINO *et al.*, 2020), antimutagênica (RESENDE *et al.*, 2012; ROBERTO *et al.*, 2016), e cicatrizante (BERRETTA *et al.*, 2012; PEI *et al.*, 2016; EBADI e FAZELI, 2021).

Um estudo *in vivo* em modelo de rato demonstrou que o Artepelin C foi responsável por redução de edema, aumento do número de neutrófilos e diminuição de prostaglandina E₂, bem como pela redução da produção de óxido nítrico em modelos *in vitro*, sugerindo a atividade anti-inflamatória deste composto principalmente durante a inflamação aguda (PAULINO *et al.*, 2008). Outros estudos demonstram diminuição de inflamação através da redução de células inflamatórias, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, assim como do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) (MACHADO *et al.*, 2012; HORI *et al.*, 2013). A redução da inflamação excessiva e persistente, que ocorre nas feridas crônicas e infectadas, é importante para auxiliar na cicatrização destas lesões (WOLCOTT *et al.*, 2008). A atividade antioxidante da própolis também auxilia na cura das feridas, uma vez que previne danos em fibroblastos causados por espécies oxidativas, e mantém a expressão normal de colágeno, que é diminuída em presença dessas espécies. Dessa forma, a própolis ameniza o estresse oxidativo no local da ferida, funcionando como um agente protetor e cicatrizante (CAO *et al.*, 2017). Ainda, foi demonstrado que a própolis causa um aumento na migração e proliferação de fibroblastos, mantendo sua viabilidade e contribuindo assim para o processo de cicatrização (EBADI e FAZELI, 2021). A aplicação tópica de própolis em ratos diabéticos acelerou o fechamento das feridas através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias e aumento da produção de colágeno (HOZZEIN *et al.*, 2015).

Um dos trabalhos que deu suporte à escolha das concentrações de própolis utilizadas neste estudo, foi o de BERRETTA *et al.* (2012), em que um gel contendo EPP-AF® promoveu o completo fechamento de feridas, com a devida formação da camada córnea e organização do tecido epitelial, especialmente com as amostras contendo 2,4 % e 3,6 %. BARUD *et al.* (2013) produziram membranas de CB

incorporadas com EPP-AF®, nestas mesmas concentrações, e observaram o favorecimento da reparação tecidual em menor tempo e de forma mais efetiva, além de inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas, incluindo cepas de MRSA.

Devido às suas vantajosas propriedades, a própolis vem sendo utilizada de forma terapêutica há milhares de anos e é bastante difundida pela cultura popular. Existem relatos do seu uso desde o início da humanidade, passando pelos egípcios, que a utilizavam para embalsamar corpos, e pelos gregos e romanos, onde era reconhecida por ser um agente antisséptico, antigripal e cicatrizante natural (WANG *et al.*, 2017; CAUICH-KUMUL e CAMPOS, 2019). A própolis continua sendo muito empregada na medicina popular e é comercializada na forma de enxaguante bucal, extratos alcoólicos ou glicólicos, cápsulas e pó, sendo amplamente aplicada no tratamento de infecções de garganta e inflamações, úlceras, halitose, eczema, e também na formulação de cosméticos (PEREIRA *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2011; ORYAN *et al.*, 2018). Nas últimas décadas, vem despertando grande interesse de pesquisadores e empresas, e está se difundindo pela ciência.

Como o comportamento biológico da própolis pode ser alterado de acordo com sua origem, composição e diferentes processos de extração, a empresa Apis Flora Co. (Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), fornecedora da matéria-prima para a realização deste trabalho, padronizou em colaboração com universidades brasileiras o extrato de própolis verde brasileira proveniente da espécie vegetal *B. dracunculioflia*, proporcionando maior segurança para sua utilização clínica e em pesquisas e permitindo a reprodutibilidade dos lotes (BERRETTA *et al.*, 2012). O desenvolvimento do extrato padronizado resultou em um depósito de patente publicado na Revista de Propriedade Industrial N°. 1778, de 01/02/2005 (patente PI 0405483-0) e este produto confirmou sua eficácia em relação às diversas atividades biológicas já citadas (CUSINATO, 2019).

Recentemente, Berretta *et al.* (2020), reuniram estudos propondo diferentes mecanismos através dos quais a própolis pode ser uma excelente alternativa para o tratamento e manejo de COVID-19. Dentre eles, é citada a inibição de duas importantes proteínas de entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras, além da modulação da expressão de uma quinase envolvida na inflamação pulmonar, formação de fibrose e supressão do sistema imunológico. Estudos *in vitro* e *in vivo*, pré-clínico e clínico comprovaram a atividade antiviral, imunomoduladora e anti-

inflamatórias da própolis, mostrando o grande potencial deste material na terapêutica da doença que está impactando o mundo (Berretta *et al.*, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar formulações tópicas à base de biocelulose e EPP-AF® visando uma nova forma de tratamento para feridas, com foco em estimular a cicatrização, além de controlar ou evitar infecções.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Produzir formulações tópicas na forma de hidrogel à base de CB, contendo EPP-AF®;
- II. Analisar as características físico-químicas e estruturais das formulações produzidas;
- III. Quantificar própolis nos hidrogéis e analisar seu perfil de liberação;
- IV. Avaliar o potencial mutagênico das formulações.

3. METODOLOGIA

3.1. Desenvolvimento das formulações em forma de hidrogel

3.1.1. Produção de celulose bacteriana

A biocelulose utilizada como matriz para a preparação dos hidrogéis foi obtida através do cultivo da bactéria Gram-negativa *K. rhaeticus*, isolada e geneticamente sequenciada por Dos Santos *et al.* (2014). A cepa, denominada AF-1, foi mantida sob refrigeração entre 4 e 8 °C em meio de cultura Hestrin e Schramm (HS) sólido, composto de 20 gL⁻¹ de glicose, 5 gL⁻¹ de extrato de levedura, 5 gL⁻¹ de peptona, 2,5 gL⁻¹ de fosfato de sódio (Na₂HPO₄), 1,15 gL⁻¹ de ácido cítrico, 20 gL⁻¹ de ágar e água destilada. A bactéria foi reativada através de incubação em estufa (Marconi) BOD (do inglês *Biochemical Oxygen Demand*) a 28 °C por 48 h e então inoculada em meio HS líquido, previamente autoclavado a 121 °C por 20 minutos, constituído de 50 gL⁻¹ de glicose, 4 gL⁻¹ de extrato de levedura, 0,73 gL⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄), 2 gL⁻¹ de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 20 gL⁻¹ de etanol e água destilada.

De acordo com a metodologia estabelecida por Machado *et al.* (2016), a solução bacteriana foi mantida em cultivo estático em BOD a 28 °C por 24 h, formando o pré-inóculo a partir do qual foram retiradas alíquotas para a produção das membranas de celulose. Para isso, utilizou-se a proporção de 1:10 de pré-inóculo e caldo HS, que foram então inoculados em erlenmeyers de 1 L e posteriormente incubados a 28 °C por 120 h sob cultivo estático.

3.1.2. Purificação da CB

Para a extração de resíduos, as membranas produzidas foram lavadas repetidamente em água corrente e depois submetidas a tratamento químico em solução 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH) durante 45 minutos em banho-maria a 80 °C, seguido de lavagens exaustivas em água destilada, até que fosse atingido pH neutro. As membranas purificadas foram armazenadas em refrigeração entre 4 a 8 °C dentro de recipiente com água destilada, coberto com filme plástico para evitar ressecamento e contaminação.

3.1.3. Obtenção da polpa de biocelulose

As membranas de CB hidratadas e purificadas foram adicionadas em béquer com água destilada em quantidade suficiente para cobri-las e, então, trituradas em elemento dispersor de alta rotação do tipo Ultraturrax (IKA), com velocidade de 20.000 rpm durante 5 minutos, até que fosse obtida uma suspensão de aspecto homogêneo. Essa suspensão foi submetida à filtragem para remoção de água, através de uma peneira para análise granulométrica malha 35 de aço inox, até obtenção de uma polpa concentrada contendo partículas de celulose.

3.1.4. Produção das formulações

As formulações foram produzidas a partir da polpa de biocelulose, considerando uma porcentagem de 1% (m/m) de CB, em massa seca. Utilizou-se hidroxietilcelulose (Natrosol®) como agente espessante e gelificante; metilparabeno e propilparabeno (Nipagin® e Nipazol®, respectivamente), ambos conservantes; propilenoglicol, agente umectante; EPP-AF® sólido 80 %, cedido pela empresa Apis Flora – Lote: 0059 001 17; e água destilada, com quantidade suficiente para 100% da formulação. As porcentagens de cada componente utilizado no preparo das formulações estão contidas na tabela 1.

Tabela 1. Componentes utilizados no preparo das formulações.

Componentes	Formulações % (m/m)				
	HB	HCB	HCB/EPP1	HCB/EPP2	HCB/EPP3
Natrosol® (hidroxietilcelulose)	1	1	1	1	1
Nipagin® (metilparabeno)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Nipazol® (propilparabeno)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Propilenoglicol	5	5	5	5	5
Celulose Bacteriana	0	1	1	1	1
EPP-AF® (Extrato Padronizado de Própolis)	0	0	1,2	2,4	3,6
Água q.s.p.	100	100	100	100	100

Fonte: Própria

Primeiramente, Nipagin® e Nipazol® foram solubilizados em propilenoglicol sob aquecimento de 60 °C e acrescidos à polpa de CB. Em seguida, água e Natrosol® foram adicionados aos poucos ao sistema, que foi mantido sob agitação mecânica com aquecimento de 60 °C por 45 minutos durante todo o processo. Dessa forma, foi produzido o hidrogel base de biocelulose (HCB).

Para as formulações contendo EPP-AF®, anteriormente à adição do Natrosol®, foi adicionado o extrato de própolis solubilizado em água, em quantidades suficientes para obtenção das concentrações finais de 1,2 %, 2,4 % e 3,6 % (m/m). (Berretta *et al.*, 2012; Barud *et al.*, 2013), formando as amostras denominadas HCB/EPP1, HCB/EPP2 e HCB/EPP3, respectivamente. Foi produzido também um hidrogel somente à base de Natrosol®, sem a presença de CB e EPP-AF®, denominado HB.

3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A imagens de microscopia eletrônica foram obtidas por meio de um Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo, modelo JEOL (JMF-6700F), localizado no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Araraquara, SP). As amostras foram previamente liofilizadas e, para a realização do teste, foram adicionadas sobre um suporte de cobre e recobertas com uma camada de carbono.

3.3. Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR dos hidrogéis, da membrana de CB liofilizados, e do extrato seco de própolis foram obtidos através do espectrômetro Cary 630 (Agilent Technologies), pelo método de reflectância total atenuada (FTIR-ATR), com região de absorção em 4000 a 600 cm^{-1} , 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

3.4. Análise Térmica

Ensaio de Termogravimetria (TG) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) foram realizados utilizando o equipamento SDT Q600 (TA Instruments). As amostras foram aquecidas a uma taxa constante de 10 °C min^{-1} , iniciando em 30 °C e

finalizando em 600 °C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL min⁻¹. Para esta análise, todas as amostras foram liofilizadas previamente.

3.5. Reologia

Foram determinadas as curvas de fluxo de tensão de cisalhamento por taxa de cisalhamento e viscosidade por taxa de cisalhamento, mantendo as formulações em temperatura de 25 °C. Foi utilizada taxa de cisalhamento de 0 a 280 Pa s⁻¹ para o fluxo ascendente durante 120 segundos, e de 280 a 0 Pa s⁻¹ para o fluxo descendente, durante 120 segundos. Para isso, foi utilizado um reômetro TA Instruments (AR1500), equipado com geometria de cone 2°, e os resultados foram analisados pelo *software* TRIOS v. 5.1.1.

3.6. Perfil Cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas na empresa Apis Flora, localizada em Ribeirão Preto, SP, em colaboração com Dra. Andresa Aparecida Berretta e Nathaly Alcazar Amorim, através do método utilizado por BERRETTA *et al.* (2012).

Inicialmente, as amostras foram diluídas em 15 mL de metanol (grau HPLC) em balões volumétricos de 25 mL e submetidas à sonificação por 10 minutos. O volume foi preenchido com ácido fórmico 0,1% e as amostras foram depositadas em *vials* através de seringa com filtro de 0,45 µL.

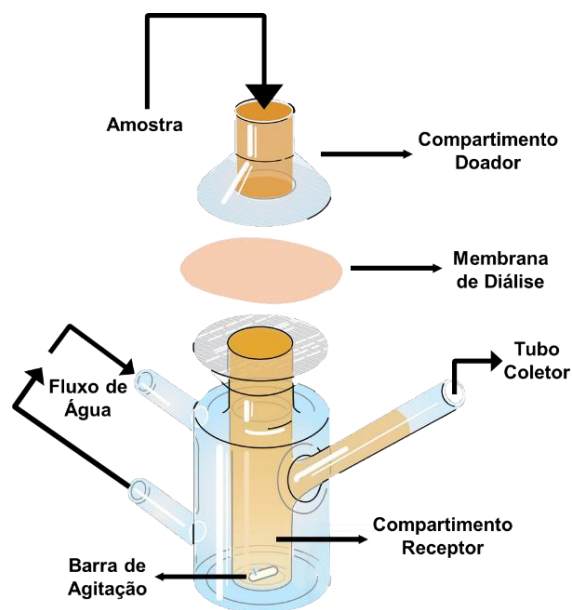
As análises foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japan) equipado com um controlador CBM-20A, uma bomba quaternária LC-20AT, detector com arranjo de diodos modelo SPD-M 20A e *software* LabSolution versão 5.92. Foi utilizada coluna Shimadzu Shim-Pack 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de 5µm e diâmetro de poro de 100 Å. A fase móvel consistia em metanol e uma solução aquosa de ácido fórmico (0,1 % v/v). O gradiente de eluição utilizado foi de 20-80 % em um período de 77 minutos a um fluxo de 0,8 mL min⁻¹, e o volume de amostra injetado foi de 10 µL. O forno de coluna foi ajustado a 40 °C e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 275 nm. Os compostos foram identificados por comparação com padrões cromatográficos obtidos de Sigma Aldrich

– Saint Louis, USA (ácido *p*-cumárico) e Wako Chemical Industries Co – Saka, Japan (artepelin C); a bacarina foi isolada, purificada e fornecida pelo Prof. Jairo Kenupp Bastos, da Universidade de São Paulo. Estes marcadores foram escolhidos para a determinação do perfil cromatográfico das formulações porque eles foram utilizados na padronização do extrato de própolis.

3.7. Estudo de liberação

O estudo de liberação foi realizado em Célula de Franz modificada, um sistema de difusão estática com temperatura controlada através do fluxo de água por banho termostaticado, cuja representação está contida na figura 4. O sistema consiste em células de vidro que são compostas por um compartimento doador, onde foram adicionados 500 mg de amostra, e por um compartimento receptor que foi preenchido com 10 mL de uma solução composta de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,5), cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % e óleo de rícino hidrogenado e etoxilado 12 % (CAS n. 61788-85-0). Este último componente é um tensoativo não-iônico que auxilia na solubilização de substâncias, permitindo o fluxo para a solução receptora, que ocorre através de uma membrana de diálise, posicionada entre os compartimentos.

Figura 4. Representação esquemática dos componentes da célula de Franz.



Fonte: Adaptado de PermeGear.

Em tempos predeterminados dentro de um período de 72 h, 500 µL da solução receptora de cada amostra era coletada e o mesmo volume de solução receptora pura era repostado em cada célula. As amostras recolhidas foram analisadas por HPLC para quantificação dos marcadores da própolis ácido *p*-cumárico e Artepelin C. Para determinar corretamente a quantidade dos marcadores, foram realizados ajustes matemáticos de diluição.

As experiências foram realizadas em duplicata para os hidrogéis contendo própolis, e seus perfis de liberação foram determinados através de gráficos que mostram a liberação dos marcadores por período de tempo.

3.8. Ensaio de mutagenicidade – Teste de Ames

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia de pré-incubação desenvolvida por Maron e Ames (1983) e o estudo foi efetuado no Laboratório de Mutagênese da Universidade de Araraquara (UNIARA), em colaboração com Prof. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira. Foram utilizadas as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *Salmonella typhimurium*, em experimentos com e sem ativação metabólica.

Baseando-se em testes preliminares de toxicidade, foram preparadas soluções dos hidrogéis puros e contendo própolis em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração final de 0,01 g/mL. Em seguida, uma pequena quantidade da cultura bacteriana, inicialmente mantida sob congelamento, foi inoculada em 30mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2) e incubada a 37 °C, por 14 a 16 h, em shaker incubador a 7 °C e 100 rpm, de modo a obter uma densidade de 1-2 x 10⁹ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL). Foram adicionados às soluções amostrais 0,1 mL de cultura de bactérias, 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M ou 0,5 mL de 4 % de mistura S9, seguido de incubação a 37 °C por 20 a 30 minutos.

A fração microssomal S9, um homogeneizado de fígado de rato Sprague *Dawley*, foi adquirida sob a forma liofilizada da Moltox Molecular Toxicology Ing., Boone, USA. A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou após ser metabolizada ou ativada. O sistema de ativação metabólica consiste de 4 % de fração S9, 1 % de cloreto de magnésio 0,4 M, 1 % de cloreto de potássio 1,65 M, 0,5 % de glicose-6-fosfato 1 M e 4 % de b-nicotinamida adenina

dinucleotídeo fosfato 0,1 M, além de 50 % de tampão fosfato 0,2 M pH 7,4 e 39,5 % de água destilada estéril (MARON e AMES, 1983).

Após o período de incubação, 2 mL de *top agar* (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados aos tubos. O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do *top agar*, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Ao final desse período foi realizada manualmente a contagem do número de colônias revertentes por placa. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa em experimentos sem a mistura S9 foram 4 -nitro-o-fenilenodiamina (10 µg/placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg/placa) para TA102. 2-aminoantraceno (1,25 µg/placa) foi utilizado para TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/placa), para TA102 nos experimentos com ativação metabólica. O controle negativo (água destilada) teve como objetivo expor a taxa de reversão espontânea das linhagens.

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983). Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos, quando não especificado.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein et al. (1982). Os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{IM} = \frac{\text{número de revertentes/ placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{número de revertentes/ placa com o controle negativo (solvente)}}$$

(Equação 1)

A amostra é considerada mutagênica quando houver uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM for maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMAN e ZEIGER, 2000).

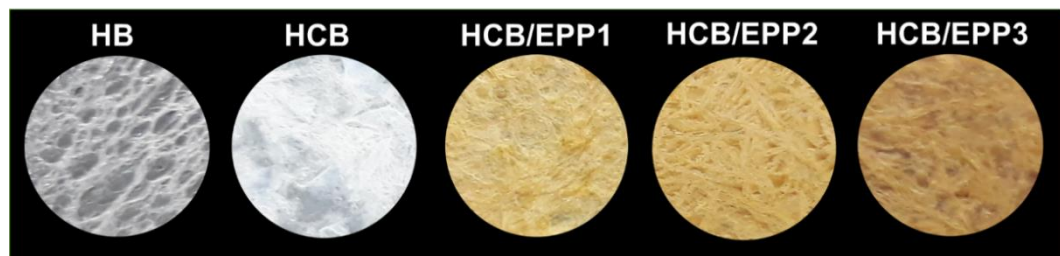
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Produção dos hidrogéis

Foram produzidas cinco formulações na forma de hidrogel. A primeira formulação, um hidrogel base contendo apenas os reagentes espessante, umectante e conservante, denominada HB. As quatro formulações restantes foram preparadas à base de CB, sendo uma composta apenas de CB e três contendo EPP-AF® nas concentrações de 1,2%, 2,4% e 3,6% (m/m), respectivamente, denominadas HCB, HCB/EPP1, HCB/EPP2 e HCB/EPP3.

Foi observado que a tonalidade âmbar dos hidrogéis contendo própolis (HCB/EPP1, HCB/EPP2 e HCB/EPP3) ocorreu de forma dose-dependente. O hidrogel de CB (HCB), sem própolis, apresentou coloração branca devido às fibras de celulose compactadas, e o hidrogel que não continha biocelulose apresentou elevada transparência (HB) (Fig. 5).

Figura 5. Aspecto macroscópico das formulações liofilizadas. HB: hidrogel base de Natrosol®; HCB: hidrogel de CB; HCB/EPP1: hidrogel CB + 1,2% EPP-AF®; HCB/EPP2: hidrogel CB + 2,4% EPP-AF®; HCB/EPP3: hidrogel CB + 3,6% EPP-AF®.



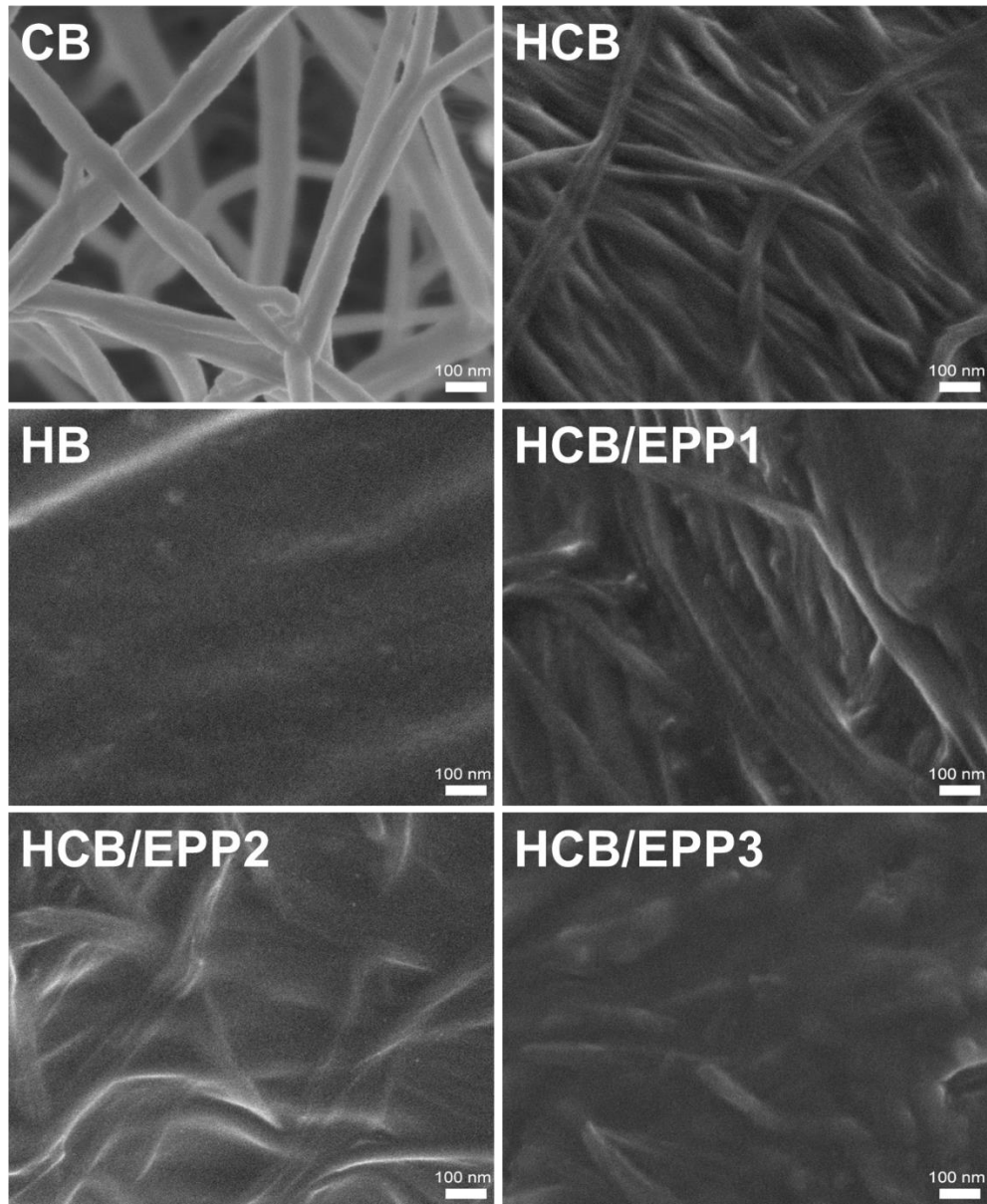
Fonte: Própria.

4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através de imagens obtidas por MEV, foi possível analisar a estrutura e morfologia microscópica da superfície das amostras liofilizadas (Fig. 6). Os hidrogéis contendo CB mantiveram a estrutura em forma de rede tridimensional formada por nanofibras de celulose com alto grau de entrelaçamento entre si, dispostas de forma aleatória, confirmando a estrutura porosa característica da biocelulose (BARUD *et al.*, 2008; BARUD *et al.*, 2016). O diâmetro das nanofibras variou entre 20 e 80 nm, valor

próximo de outros resultados encontrados na literatura (BARUD *et al.*, 2008; PACHECHO *et al.*, 2017).

Figura 6. Micrografias dos hidrogéis e da membrana de CB liofilizados.



Fonte: Própria.

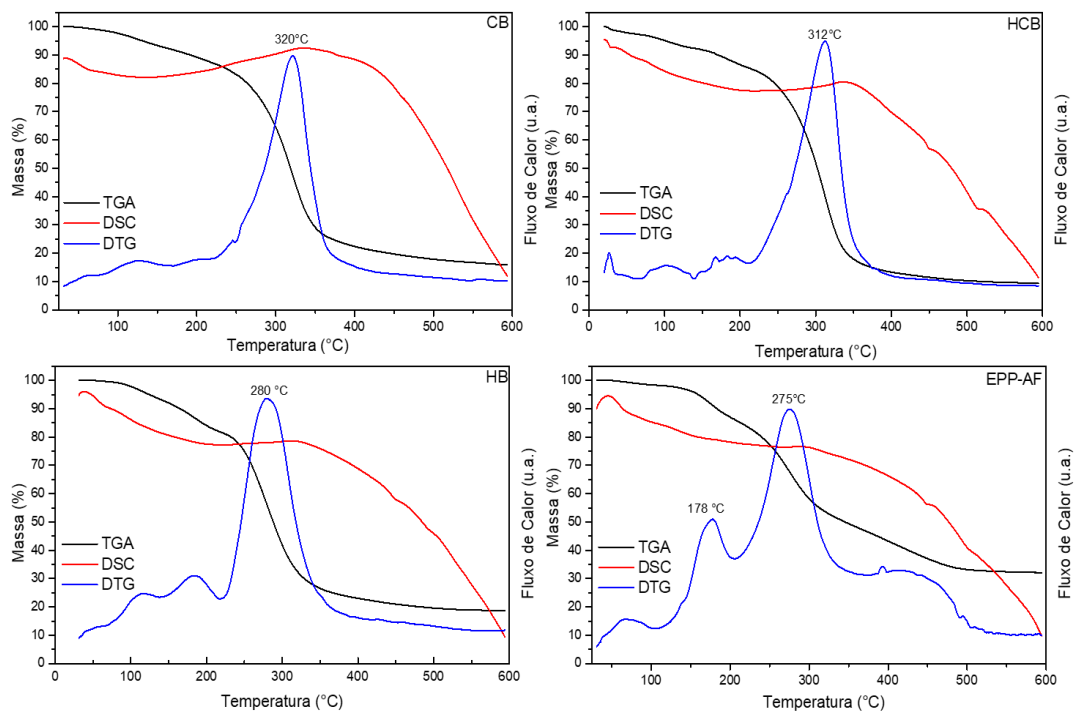
Visualmente, a superfície do gel base de Natrosol® (HB) se mostrou menos rugosa e ficou evidente a ausência de nanofibras. Momekova *et al.* (2020) confirmam o aspecto mais homogêneo deste material em imagens de microscopia.

É possível observar que, no hidrogel contendo a maior concentração de própolis, HCB/EPP3 (3,6% EPP-AF®), as fibras de celulose se tornaram menos visíveis e mais compactadas, sugerindo a incorporação da própolis nas formulações e a formação de um novo material compósito.

4.3. Análise térmica

As figuras 7 e 8 mostram os resultados da Análise Termogravimétrica (TG), com sua respectiva derivada (DTG), e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), onde foi possível comparar, separadamente, o comportamento térmico da biocelulose, de EPP-AF® e dos hidrogéis produzidos.

Figura 7. Curvas de TG, DTG e DSC de CB, HCB, HB e EPP-AF®.



Fonte: Própria.

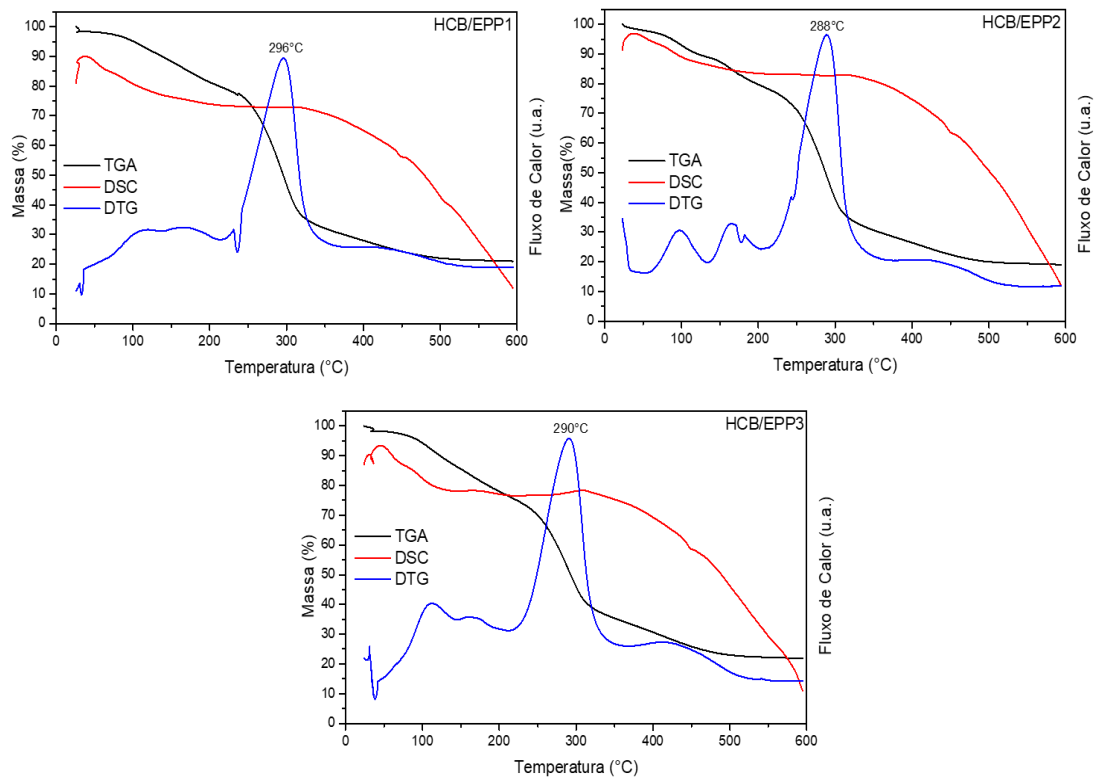
A CB apresentou perfil térmico característico, constando de dois principais eventos térmicos. No primeiro ocorreu uma pequena perda de massa, em torno de 10 %, nas faixas de temperatura de 30 a 150 °C, atribuída à perda de água presente na celulose. Entre 250 °C e 350 °C ocorre um segundo evento térmico, com grande perda de massa (70-80 %) e máximo em 320 °C, relativo à despolimerização da celulose e

decomposição das unidades glicosídicas, seguido da formação de resíduos carbônicos (BARUD *et al.*, 2013; MOHAMMADKAZEMI *et al.*, 2015). Os eventos são confirmados pelos picos endotérmicos vistos no DSC.

O hidrogel de CB (HCB) apresentou perfil térmico semelhante ao da CB pura, porém a primeira etapa de degradação, entre 25 °C e 200 °C, apresenta outros picos de perda de massa, provavelmente devido à presença dos componentes do hidrogel baseado Natrosol® (HB). Natrosol® (hidroxietilcelulose) é um éster derivado de celulose cujo comportamento térmico se assemelha ao da biocelulose, porém com estabilidade térmica discretamente inferior (GONG *et al.*, 2019). O primeiro evento térmico, que teve início em temperatura ambiente e se estendeu até aproximadamente 200 °C, mostra perda de massa em torno de 20 %. Em seguida, entre 220 e 350 °C, houve perda de massa de cerca de 70 %, com máximo em 280 °C, conforme a curva DTG. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Zulkifi *et al.*, 2017, que sugerem que estes processos possam ser atribuídos à vaporização de água e degradação das cadeias poliméricas, respectivamente.

A curva TG do EPP-AF® apresentou eventos associados de decomposição dos componentes da própolis, sucessivos e/ou simultâneos, iniciando em temperatura ambiente, com 5 % de perda de massa até 178 °C, confirmado pela DGT. Este evento está relacionado à evaporação dos compostos voláteis presentes no extrato (ROCHA *et al.*, 2012). Entre 200 °C e 500 °C ocorreu a maior parte da degradação da própolis, com perda de massa em torno de 60 % e máximo em 275 °C, atribuída à quebra das ligações carbônicas e degradação dos compostos orgânicos (BARUD *et al.*, 2013).

Figura 8. Curvas de TG, DTG e DSC de HCB/EPP1, HCB/EPP2 e HCB/EPP3.



Fonte: Própria.

Os hidrogéis de biocelulose com própolis (Fig. 8) mostraram comportamento térmico intermediário entre a CB e o EPP-AF®, com discreta diminuição de estabilidade térmica. Assim como no trabalho de Barud *et al.* (2013), o início da desidratação das formulações se deu por volta de 50 °C, sugerindo que elas se mantenham hidratadas após aplicação sobre a pele. Após esta temperatura, os hidrogéis passam a perder massa continuamente, com máximo em torno de 290 °C e finalizando em 550 °C. Esses eventos estão relacionados com a condensação de grupos OH, quebra de ligações carbônicas e degradação dos compostos orgânicos da própolis, assim como a degradação da biocelulose (BARUD *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2012).

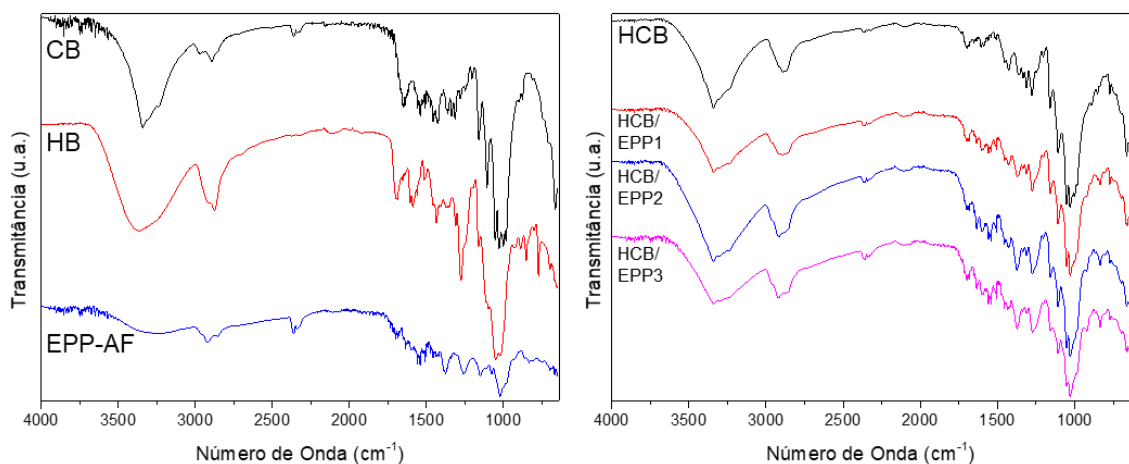
A curva TG do hidrogel com maior concentração de própolis (HCB/EPP3) se assemelha mais com o perfil de perda de massa da própolis, enquanto que o hidrogel com a menor proporção do extrato (HCB/EPP1) se mostra mais próximo de

HB e HCB. Estes dados corroboram com os resultados de MEV e confirmam a formação de um novo material contendo biocelulose e própolis.

4.4. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A figura 9 apresenta os espectros de FTIR. A banda em torno de 3300 cm^{-1} , característica de estiramento O-H (DAYAL *et al.*, 2013), é observada em todos os espectros, porém se apresenta de forma mais discreta no extrato seco de própolis (EPP-AF®) e mais intensa na CB pura e nos hidrogéis contendo CB (HCB, HCB/EPP1, HCB/EPP2, HCB/EPP3). As bandas em 1680 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} correspondem à vibração de estiramento C=O de flavonoides e C=C de anéis aromáticos, respectivamente, e são características de compostos fenólicos da própolis (RADOVANOVIC *et al.*, 2019). Ambas estão presentes no espectro de EPP-AF® e dos hidrogéis, indicando a presença da própolis nas formulações. Outra banda característica que confirma a presença da própolis nos hidrogéis se encontra em torno de 835 cm^{-1} , referente à deformação angular de anéis aromáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Figura 9. Espectros vibracionais no infravermelho de CB, HB, EPP-AF®, HCB, HCB/EPP1, HCB/EPP2 e HCB/EPP3.



Fonte: Própria.

Em torno de 2850 cm^{-1} existe uma banda discreta em EPP-AF®, que se repete nos hidrogéis contendo própolis, se tornando mais acentuada na formulação mais concentradas (HCB/EPP3). As bandas entre 2850 e 2970 cm^{-1} nos espectros de CB, HB e EPP-AF® apresentam-se sobrepostas nos hidrogéis, indicando uma interação entre esses componentes e a formação de um novo material compósito.

4.5. Reologia

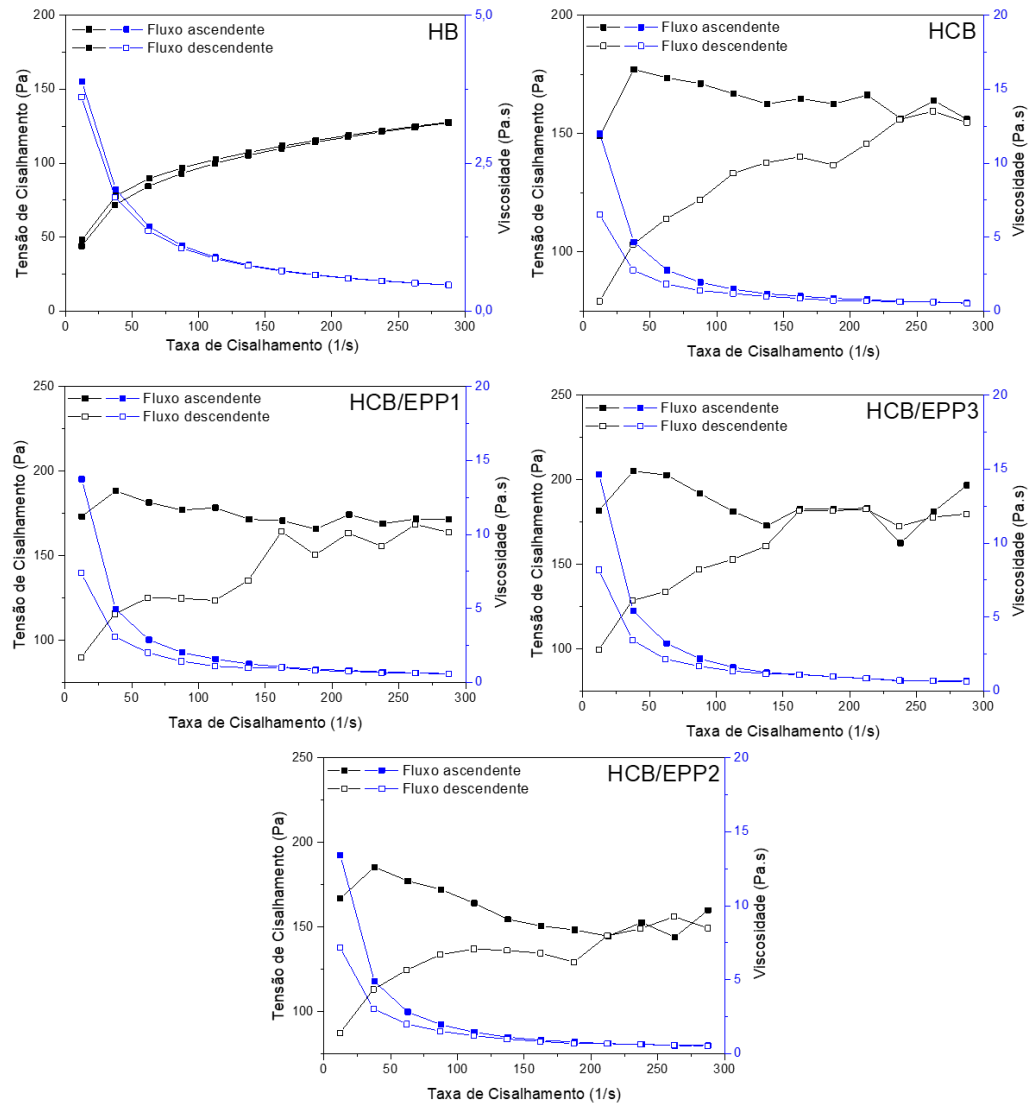
É importante conhecer a reologia de formulações farmacêuticas para obtenção de informações sobre seu comportamento e estabilidade, fundamental para o controle de qualidade, aceitação do produto pelo consumidor e eficácia da formulação (CORRÊA *et al.*, 2005).

As curvas de fluxo de tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento, figura 10, não apresentam uma relação linear proporcional, caracterizando as formulações como sistemas não-Newtonianos (CARBINATTO *et al.*, 2018). Também é possível observar que a viscosidade das formulações diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, o que demonstra o comportamento pseudoplástico dos hidrogéis (SCHRAMM, 2005).

Alguns sistemas pseudoplásticos apresentam uma propriedade denominada tixotropia, comum em formulações poliméricas, em que a viscosidade diminui com aplicação de uma tensão de cisalhamento, mas depois retorna gradualmente quando a tensão é removida, através da micro-reestruturação de seus elementos (SCHRAMM, 2005). No sistema tixotrópico, as curvas de fluxo ascendente e descendente não estão sobrepostas, mas formando uma área entre elas, denominada de área de histerese (LEE *et al.*, 2009), observada nos reogramas de todas as formulações, demonstrando seu tixotropia.

Essa é uma importante característica para formulações de aplicação tópica devido à maior facilidade para retirar o conteúdo da embalagem e por permitir o espalhamento do produto sobre a pele evitando seu escoamento (LEE *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2012). Ainda, materiais com características tixotrópicas tendem a ter sua vida de prateleira aumentada porque mantêm a viscosidade constante durante o armazenamento, dificultando a separação dos constituintes da formulação (DE VICENTE, 2012; CARBINATTO *et al.*, 2018).

Figura 10. Curvas de fluxo ascendentes e descendentes da tensão de cisalhamento e viscosidade por taxa de cisalhamento.



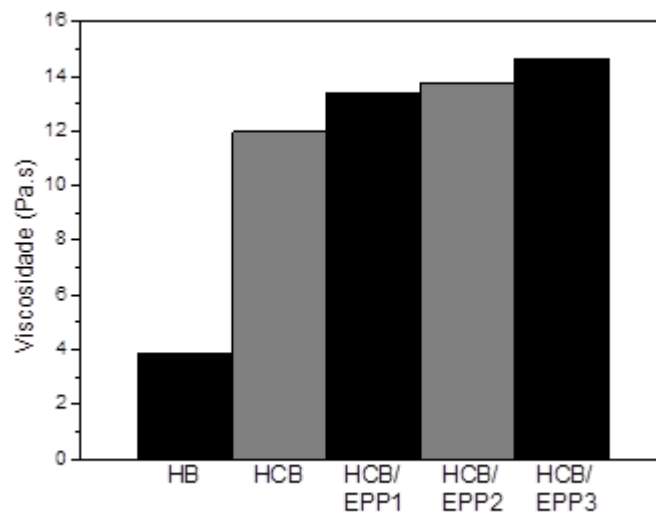
Fonte: Própria.

Nos gráficos, é possível observar que existe uma diferença entre a curva de fluxo e área de histerese dos hidrogéis de base Natrosol®, HB, e aqueles contendo biocelulose (HCB, HCB/EPP1, HCB/EPP2 E HCB/EPP3). O comportamento das curvas destas formulações e a presença de uma maior área de histerese em relação à HB pode estar relacionada à presença de partículas de CB aumentando a consistência destes hidrogéis e tornando-os mais heterogêneos. Portanto, eles

apresentam maiores valores de viscosidade, que aumentam conforme o acréscimo da porcentagem de própolis nas formulações (Fig. 11).

Um hidrogel comercial baseado em CB, produzido pela empresa brasileira Seven Indústria de Produtos Biotecnológicos Ltda., também demonstrou comportamento pseudoplástico e tixotrópico (CARBINATTO *et al.*, 2018), porém com menor área de histerese e viscosidade em comparação com os produzidos neste trabalho, tendo sua curva de fluxo mais semelhante à do hidrogel base que não contém biocelulose, HB.

Figura 11. Viscosidade de cada formulação produzida, demonstrando aumento com a presença de CB e aumento proporcional conforme a porcentagem de própolis incorporada.



Fonte: Própria.

4.6. Perfil Cromatográfico

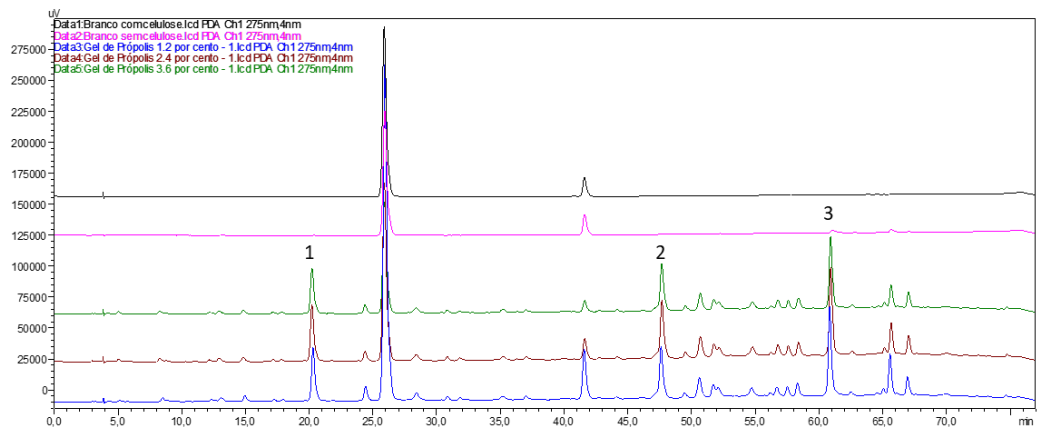
Através de análise cromatográfica dos hidrogéis por HPLC, foi realizada a quantificação de compostos químicos considerados biomarcadores da própolis, cujo resultado está contido na tabela 2. O perfil químico obtido é mostrado na figura 12, onde identificou-se: (1) ácido p-cumárico, (2) Artepelin C e (3) bacarina, de acordo com dados da literatura (BERRETTA *et al.*, 2012; BAPTISTA, 2016).

Tabela 2. Composição química dos marcadores de EPP-AF® contidos nos hidrogéis.

Marcador	Concentração Média (mg/g) ± DP		
	HCB/EPP1 (1,2%EPP-AF®)	HCB/EPP2 (2,4%EPP-AF®)	HCB/EPP3 (3,6%EPP-AF®)
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,151 ± 0,0008	0,336 ± 0,0160	0,453 ± 0,0042
Artepelin C	0,782 ± 0,0154	1,583 ± 0,0740	2,171 ± 0,0404
Bacarina	0,103 ± 0,00262	0,17 ± 0,00738	0,211 ± 0,0034

Fonte: Própria.

Figura 12. Perfil cromatográfico dos hidrogéis, em que os picos enumerados são correspondentes à presença de: 1-ácido *p*-cumárico; 2-Artepelin C; 3-bacarina.



Fonte: Própria

Conforme o esperado, as quantidades de ácido *p*-cumárico e Artepelin C encontradas nos hidrogéis foram proporcionais à concentração de extrato de própolis incorporada em cada formulação, sendo: HCB/EPP1 (1,2 % EPP-AF®), HCB/EPP2 (2,4 % EPP-AF®) e HCB/EPP3 (3,6 % EPP-AF®). Porém, para a bacarina essa proporção não se manteve e isso pode ser devido à sua degradação durante o experimento, à menor estabilidade ou maior dificuldade de extração deste composto.

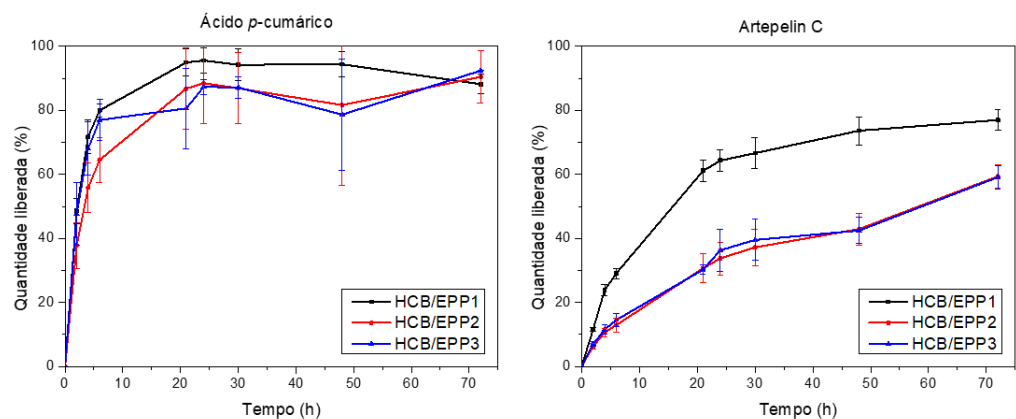
Os picos observados nos cromatogramas são referentes aos marcadores citados e estão em conformidade com os dados da literatura (BERRETTA *et al.*, 2012; BARUD *et al.*, 2013; MARQUELE-OLIVEIRA *et al.*, 2019). Artepelin C é o principal constituinte do extrato de própolis (BERRETTA *et al.*, 2012) e aparece em maior quantidade nas respectivas formulações em relação aos outros marcadores.

As amostras HB e HCB, evidentemente, não apresentam os picos característicos dos marcadores pois não contém EPP-AF®. Os demais picos possivelmente estão relacionados aos outros componentes presentes nas formulações.

4.7. Ensaio de Liberação

Este estudo foi realizado para avaliar a quantidade dos biomarcadores ácido *p*-cumárico e Artepelin C, presentes no extrato de própolis, que foi liberada pelas formulações contendo EPP-AF® através do tempo. Os perfis de liberação são mostrados na figura 13.

Figura 13. Perfis de liberação de ácido *p*-cumárico e Artepelin C de cada formulação em um período de 72 h.



Fonte: Própria.

Apesar de Artepelin C ser o marcador presente em maior concentração no extrato de própolis, ele foi liberado das formulações em menores proporções em relação ao ácido *p*-cumárico. Marquele-Oliveira *et al.* (2019) encontraram resultados

semelhantes em um estudo com membranas de CB contendo microemulsão de própolis e atribuíram este comportamento à polaridade dos marcadores.

Possivelmente devido à sua maior hidrofiliçidade, 50 % de ácido *p*-cumárico foi liberado das formulações em um período de 2 a 3 h, enquanto que no mesmo período, a quantidade liberada de Artepelin C, que é um composto lipofílico, foi em torno de 10 a 15 %. Este biomarcador, teve metade de seu conteúdo liberado pela formulação menos concentrada, HCB/EPP1, após 15 h de experimento, ao passo que as formulações mais concentradas liberaram 50 % de Artepelin C somente após aproximadamente 60 h, apresentando uma liberação mais prolongada. Isso pode ter ocorrido devido à maior concentração de EPP-AF® nestes hidrogéis, levando a maiores interações químicas entre as moléculas da própolis e a matriz de CB, como ligações de hidrogênios e de Van der Waals, que podem ter causado um aprisionamento da própolis nas redes tridimensionais nanométricas da biocelulose, diminuindo sua liberação. Esta hipótese corrobora com os resultados observados por MEV, no qual as imagens apresentam as fibras de CB mais compactadas conforme o aumento da concentração de própolis.

Ao final de 5 h, em torno de 60 a 70 % de ácido *p*-cumárico havia sido liberado das formulações, enquanto que apenas 10 a 20 % de Artepelin C foi detectado na solução receptora no mesmo período de tempo. As quantidades máximas liberadas foram em torno de 90 a 100 % em até 21 h de experimento para o ácido *p*-cumárico, em contraste com média de 75 % de liberação de Artepelin C em 72 h.

Apesar da diferença de liberação entre os biomarcadores, ambas as liberações podem ser consideradas prolongadas em comparação com outros trabalhos utilizando biocelulose como matriz para liberação de fármacos. Fontes *et al.* (2018), por exemplo, impregnaram um fármaco em compósitos de CB/ carboximetilcelulose e obtiveram como resultado um *burst* de liberação de 70–80 % em 15 minutos, tempo significativamente menor em relação ao encontrado neste trabalho. Esse fenômeno, em que grande parte do ativo é liberada em um curto período de tempo, não foi encontrado nesta pesquisa e este resultado é interessante considerando a aplicação tópica e a finalidade das formulações, que com uma liberação mais prolongada podem promover a cura gradual das feridas e inibição bacteriana, prolongando o tempo de uso dos hidrogéis (HUANG e BRAZEL, 2001).

Já é conhecido que celulose e derivados celulósicos são amplamente utilizados na indústria farmacêutica como matriz para formulações de liberação prolongada (PANG *et al.*, 2019). No entanto, a CB ainda apresenta alguns desafios para se adequar a esta finalidade, os quais levam à estudos de modificações de suas propriedades e das propriedades dos ativos incorporados para alcançar uma liberação controlada de forma eficiente (PÖTZINGER *et al.*, 2017). Um exemplo é a produção de microemulsão de própolis por Marquele-Oliveira *et al.* (2019) que, através da incorporação dessa formulação em membranas de CB, obtiveram como resultado uma liberação mais prolongada dos ativos, alcançando 90 % de liberação de ácido *p*-cumárico e 24 % de Artepelin C em um período de 48 h.

4.8. Ensaio de Mutagenicidade – Teste de Ames

A tabela 3 apresenta a média (M) e o desvio padrão (DP) do número de revertentes por placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA 98, TA 100, TA97a e TA 102 de *S. typhimurium* após o tratamento diferentes amostras de hidrogéis com própolis, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tabela 3. Índice de mutagenicidade das formulações.

Número de revertentes (M ± DP)/placa e (IM)								
	TA98		TA100		TA102		TA97a	
µg /placa	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
DMSO	16 ± 0	26 ± 3	102 ± 8	93 ± 11	228 ± 22	289 ± 31	146 ± 10	120 ± 18
HCB	14 ± 1 (0,88)	27 ± 2 (1,02)	95 ± 5 (0,93)	115 ± 14 (1,23)	231 ± 12 (1,01)	254 ± 25 (0,88)	133 ± 17 (0,91)	129 ± 11 (1,08)
HCB/EPP1	10 ± 2 (0,59)	16 ± 2 (0,62)	78 ± 3 (0,77)	90 ± 18 (0,97)	128 ± 7 (0,56)	250 ± 33 (0,87)	88 ± 2 (0,60)	102 ± 17 (0,85)
HCB/EPP2	15 ± 1 (0,94)	21 ± 1 (0,81)	90 ± 4 (0,89)	95 ± 8 (1,02)	204 ± 28 (0,90)	270 ± 20 (0,94)	116 ± 14 (0,80)	113 ± 11 (0,95)
HCB/EPP3	18 ± 1 (1,13)	27 ± 2 (1,02)	98 ± 9 (0,96)	98 ± 4 (1,05)	257 ± 35 (1,13)	308 ± 35 (1,07)	175 ± 22 (1,20)	134 ± 13 (1,12)
C +	599 ± 56 ^a	927 ± 89 ^d	1266 ± 152 ^b	1886 ± 175 ^d	1882 ± 103 ^c	1266 ± 101 ^e	612 ± 62 ^a	1756 ± 135 ^d

M ± DP = média e desvio padrão; Controle negativo (C-): água destilada: 100 µL/placa; Controle positivo (C +): a4-nitro-o-fenilenodiamino (10,0 µg/ placa – TA98, TA97a); bAzida Sódica (1,25 µg/placa – TA100); cMitomicina C (0,5 µg/ placa – TA102), em ausência de S9 e d2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa – TA98, TA97a e TA100); e2-aminofluoreno (10 µg/ placa – TA102), na presença de S9. Fonte: Própria.

Os hidrogéis não induziram um aumento estatisticamente significativo no número de revertentes quando comparados ao controle negativo, apresentando IM abaixo de 2,0 em todas as cepas testadas, demonstrando assim, ausência de atividade mutagênica nas condições utilizadas neste estudo. Experimentos mostraram que a amostra HCB/EPP3 gerou maior sensibilidade das cepas utilizadas, diminuindo, portanto, os valores de IM. É provável que a maior sensibilidade das cepas esteja relacionada à maior concentração de própolis presente no hidrogel (3,6 %).

Testando géis com própolis em células de mamíferos, Senedese *et al.* (2011) não observaram efeito mutagênico e, para além disso, Resende *et al.* (2012) utilizaram o mesmo método para avaliar a presença de mutagenicidade do biomarcador Artepelin C e concluíram que esta substância apresenta atividade antimutagênica.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 1

Os estudos realizados neste capítulo até o presente momento mostraram que EPP-AF® foi devidamente incorporado nas formulações à base de biocelulose, sem modificar de forma significativa suas propriedades morfológicas, estruturais e estabilidade térmica. Além disso, os hidrogéis demonstraram comportamento pseudoplástico tixotrópico, adequado para formulações de aplicação tópica. A quantificação dos biomarcadores da própolis estava de acordo com as concentrações de extrato incorporadas, e o estudo de liberação mostrou que o ácido *p*-cumárico foi liberado em maiores proporções em relação ao Artepelin C, e a formulação menos concentrada, 1,2 % de EPP-AF® (HCB/EPP1), apresentou maior percentual de liberação de ambos os ativos em relação às mais concentradas. Todas as formulações liberaram por pelo menos 21 h, sugerindo uma liberação prolongada. Os hidrogéis não apresentaram mutagenicidade pelo teste de Ames nas concentrações testadas. Com os resultados obtidos até esta etapa, foi possível verificar o grande potencial das formulações à base de hidrogel de biocelulose contendo EPP-AF® como curativo para feridas, e possibilitou a continuidade do trabalho em experimentos com luz.

Capítulo 2

1. INTRODUÇÃO

1.2. Terapia Fotodinâmica/ Inativação Fotodinâmica (PDT/PDI)

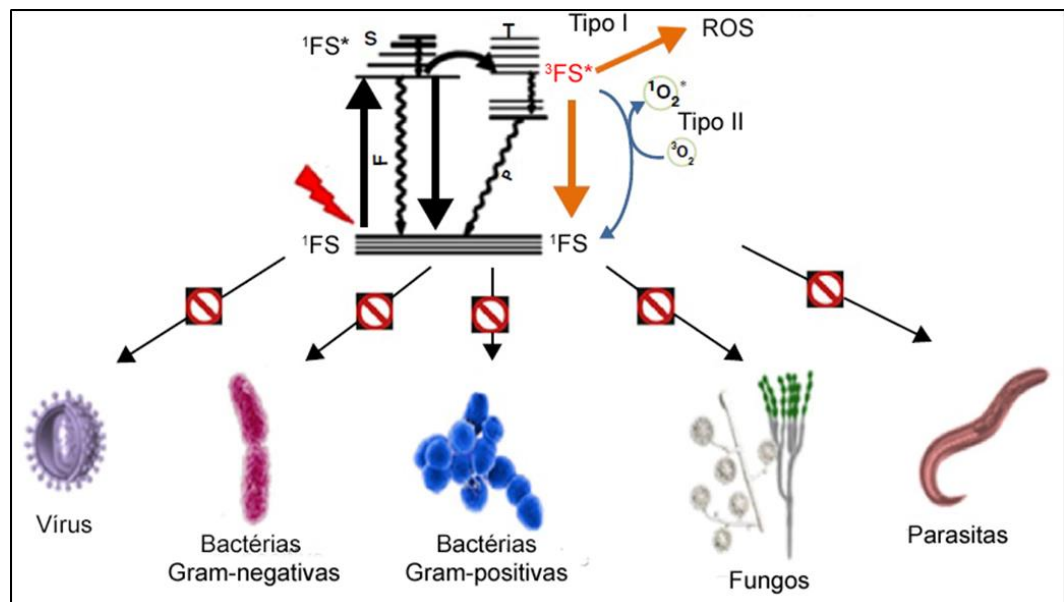
Existem relatos milenares de diversas culturas que utilizavam a luz solar para fins terapêuticos, muitas vezes associando-a a extratos vegetais como forma de tratamento para doenças de pele. Porém o avanço dos estudos das reações de fotossensibilização se deu à partir do século XIX, quando Oscar Raab observou que o efeito citotóxico dos corantes fotossensibilizadores acridina e eosina sobre uma cultura de protozoários era maior em presença de luz (SILVA *et al.*, 2009; PRATAVIEIRA *et al.*, 2015). Em 1907, von Tappeiner e Jodlbauer comprovaram a necessidade de oxigênio para a ocorrência das reações fotodinâmicas e introduziram o termo ação fotodinâmica (PRATAVIEIRA *et al.*, 2015). A partir de então, evoluíram as pesquisas em terapia fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*), que vêm demonstrando sucesso no tratamento de diversas doenças (SANTOS, 2016).

A PDT é utilizada principalmente no tratamento de câncer de pele, mas também tem se mostrado eficiente para tratar cânceres de esôfago, cabeça, pescoço, pulmão e bexiga, apresentando altas taxas de cura e poucos efeitos colaterais (PLAETZER *et al.*, 2013). Além disso, ainda demonstra bons resultados no tratamento de psoríase, degeneração macular da retina, distúrbios autoimunes, arteriosclerose, remoção de verrugas, artrite reumatoide sistêmica, micoses, parasitoses cutâneas, periodontite, acne, infecções e cicatrização de feridas (MACHADO *et al.*, 2000; PERUSSI, 2006; HUANG *et al.*, 2010; SANTOS, 2016; WEN *et al.*, 2017; NESI-REIS *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação da PDT é baseado em reações fotofísicas e fotoquímicas que ocorrem a partir da associação de agentes fotossensibilizantes (FS), oxigênio molecular (O_2) e luz. Ao absorver a energia da luz em comprimento de onda adequado, os elétrons presentes nas moléculas dos FS entram em estado energeticamente excitado (estado tripleto). Neste estado, podem transferir a energia absorvida através de reações do tipo I, gerando radicais oxidantes, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxilas (OH^\cdot), por exemplo; ou através de reações do tipo II, produzindo oxigênio singleto (1O_2) (SPERANDIO *et al.*, 2014; PRATAVIEIRA *et al.*, 2015). As espécies reativas formadas possuem alto poder oxidante e danificam as proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outras moléculas

presentes nas células, levando à morte celular por necrose ou apoptose (KWIATKOWASKI *et al.*, 2018). Inicialmente, a PDT foi publicada como sendo uma alternativa no tratamento de tumores cutâneos e destruição de microrganismos (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010; HAMBLIN, 2016). A figura 14 mostra um esquema do mecanismo de ação fotodinâmica, com a excitação energética do FS pela luz, seguida das reações do tipo I e II aplicada à inativação agentes infecciosos sendo denominada, neste caso, inativação fotodinâmica (PDI, *Photodynamic Inactivation*).

Figura 14. Mecanismo de ação da PDI sendo aplicada à inativação de vírus, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e parasitas.



Fonte: Adaptado de Hamblin (2016).

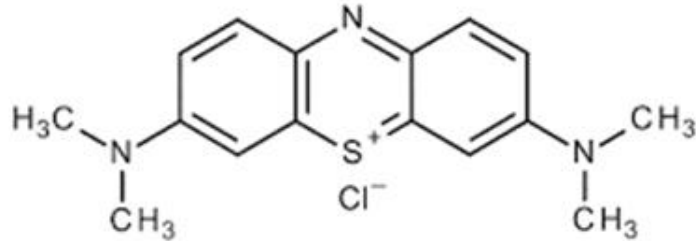
As fontes de luz utilizadas abrangem desde lâmpadas de filamento de largo espectro de emissão, passando pelo laser, que possibilita o acoplamento em fibras ópticas, permitindo aplicação de PDT em locais de difícil acesso; e mais recentemente, têm sido utilizados sistemas de diodos emissores de luz (LED, *Light Emitting Diode*), que podem ser construídos em diferentes geometrias e abranger maior área de tratamento (MORIYAMA e GRECCO, 2015; NESI-REIS *et al.*, 2017).

Um FS considerado ideal para a PDT/PDI apresenta baixa toxicidade no escuro, boa penetração na membrana celular, alto rendimento quântico, seletividade celular, solubilidade em meio fisiológico, rápida metabolização e ausência de mutagenicidade (SPERANDIO *et al.*, 2014; BUZZÁ *et al.*, 2019). Os primeiros FS utilizados, chamados de primeira geração, foram as porfirinas e seus derivados, como hematoporfirina, que são os compostos mais utilizados na clínica. Depois foi desenvolvida a segunda geração, que inclui as ftalocianinas, derivados de benzoporfirina, clorinas e corantes, como a curcumina e o azul de metileno. Há ainda uma terceira geração, representada pela conjugação de FS da primeira e segunda geração, além de diversas modificações que aprimoram suas propriedades (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Os FS, quando administrados sistemicamente, têm a desvantagem de gerar, em sua maioria, uma fotossensibilidade cutânea generalizada, que pode causar queimaduras em exposição à luz solar. Este efeito foi demonstrado pela primeira vez em 1912, quando o pesquisador Friedrich Meyer Betz se auto-injetou hematoporfirina e relatou dor intensa e prolongada, e apresentou grande inchaço nas áreas expostas à luz (PRATAVIEIRA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015). A aplicação tópica, por sua vez, facilita o acesso do FS ao local de ação, aumentando a seletividade do tratamento, o que permite a diminuição da dose e conseqüentemente, da toxicidade (SANTOS, 2016).

O azul de metileno (AM), FS utilizado neste trabalho cuja estrutura química é mostrada na figura 15, é um corante orgânico, derivado de fenotiazina, com propriedades fluorescentes e fotossensibilizantes, capaz de inativar vírus e bactérias e matar células malignas em reações com a luz e o oxigênio. Possui carga positiva e baixo peso molecular, o que facilita a interação com as células e penetração na membrana biológica. É bastante utilizado em PDI, apresentando eficácia contra diversos tipos de fungos e bactérias (TARDIVO *et al.*, 2005; CALIXTO *et al.*, 2016).

Figura 15. Estrutura química do azul de metileno.



Fonte: Adaptado de Tardivo *et al.* (2005).

Como já citado e demonstrado na figura 14, a eficiência da PDI já foi evidenciada em vários estudos laboratoriais, pré-clínicos e clínicos, que comprovam seu poder de inativação de bactérias Gram-positivas e negativas, fungos dermatófitos, leveduras, como *Candida*, e vírus, como o do herpes (HSV) e do papiloma humano (HPV), por exemplo (HAMBLIN e HASAN, 2004; PERUSSI, 2006; HUANG *et al.*, 2010; HAMBLIN, 2016). A PDI é capaz de matar microrganismos resistentes aos antibióticos conhecidos, e não demonstra formação de mecanismo de resistência, sendo cada vez mais considerada como alternativa aos tratamentos utilizando antimicrobianos convencionais (HAMBLIN, 2016). Recentemente, esta técnica têm sido sugerida como forma de terapia de COVID-19 e suas complicações (DIAS e BAGNATO, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Produzir formulações compósitas de biocelulose/própolis contendo azul de metileno para realizar testes com luz e verificar potencial uso em PDI aplicada a feridas.

2.2. Objetivos Específicos

- I. Caracterizar os hidrogéis através de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)
- II. Avaliar a emissão de fluorescência e observar por microscopia confocal de fluorescência
- III. Avaliar a atividade antimicrobiana dos hidrogéis na ausência e presença de luz (PDI)

3. METODOLOGIA

3.1. Produção de hidrogéis

Para a produção de hidrogéis contendo AM foi utilizada a mesma metodologia descrita no capítulo 1.

Foram produzidos hidrogéis com base somente de Natrosol®, sem a presença de biocelulose, grupo HB, e hidrogéis com base de Natrosol® e CB, grupo HCB. As concentrações de ambos os polímeros foram mantidas em 1 % (m/m). A concentração de EPP-AF® foi fixada no valor de 1,2 % (m/m), sendo a menor porcentagem utilizada para a produção dos hidrogéis no capítulo 1. Por fim, variou-se somente a concentração de AM, utilizando 0,01 % e 0,1 % (m/m) para as formulações AM1 e AM2, respectivamente. A quantidade de cada componente utilizado na produção de dos hidrogéis está contida nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Formulações do grupo HB.

Componentes	Formulações % (m/m)				
	HB/AM1	HB/AM2	HB/EPP1	HB/EPP1/AM1	HB/EPP1/AM2
Natrosol® (hidroxiethylcelulose)	1	1	1	1	1
Nipagin® (metilparabeno)	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Nipazol® (propilparabeno)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Propilenoglicol	5	5	5	5	5
Celulose Bacteriana	0	0	0	0	0
EPP-AF® (Extrato Padronizado de Própolis)	0	0	1,2	1,2	1,2
Azul de Metileno	0,01	0,1	0	0,01	0,1
Água q.s.p.	100	100	100	100	100

Fonte: Própria.

Tabela 5. Formulações do grupo HCB.

Componentes	Formulações % (m/m)			
	HCB/AM1	HCB/AM2	HCB/EPP1/AM1	HCB/EPP1/AM2
Natrosol® (hidroxietilcelulose)	1	1	1	1
Nipagin® (metilparabeno)	0,18	0,18	0,18	0,18
Nipazol® (propilparabeno)	0,02	0,02	0,02	0,02
Propilenoglicol	5	5	5	5
Celulose Bacteriana	1	1	1	1
EPP-AF® (Extrato Padronizado de Própolis)	0	0	1,2	1,2
Azul de Metileno	0,01	0,1	0,01	0,1
Água q.s.p.	100	100	100	100

Fonte: Própria.

3.2. Caracterizações Espectroscópicas

3.2.1. Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia na região do UV-Vis foi realizada na faixa de varredura de 350 a 800nm. Os hidrogéis foram espalhados sobre lâminas de vidro, com espessuras em torno de 1 mm e, dessa forma, posicionados no espectrofotômetro (Varian Cary® 50 Bio).

3.2.2. Espectroscopia de fluorescência

Foi utilizando um protótipo de um sistema portátil de espectroscopia de fluorescência, composto por um espectrofotômetro (USB2000, Ocean Optics - Palo Alto, Califórnia), uma fibra tipo "Y" (Ocean Optics), fonte de luz, filtros e computador. A excitação foi fornecida por um laser de diodo 405 nm e a emissão da fluorescência foi adquirida pelo espectrofotômetro, que foi conectado a um computador utilizando software OOIBase (Ocean Optics, EUA).

3.3. Microscopia Confocal de Fluorescência

Este teste foi realizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do IFSC – USP, onde as imagens foram obtidas através de um microscópio confocal LSM 780 (Carl Zeiss, Alemanha), com laser de diodo emitindo excitação em 405 nm.

3.4. Ensaio antimicrobiano

O ensaio antimicrobiano foi realizado no laboratório do Grupo de Óptica, pertencente ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica, do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da USP, em colaboração com a Dra. Thaila Quatrini Corrêa.

3.4.1. Preparo do microrganismo

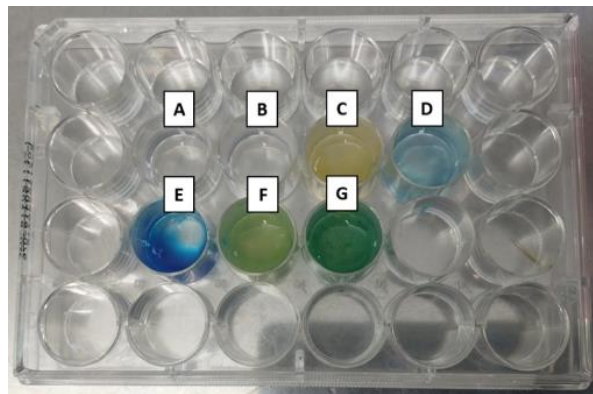
A cepa da bactéria *S. aureus* (ATCC 25923) foi reativada por meio do cultivo em placa de Petri contendo o meio de cultura *Ágar Brain Heart Infusion* (BHI) por 48 h a 37 °C. Em seguida, foi realizado o preparo do pré-inóculo. Para isso, 8 colônias de *S. aureus* foram transferidas para um tubo Falcon contendo 10 mL de meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB). O tubo foi levado para a estufa para incubação por 18 h (*overnight*) a 37 °C. Após 18 h de incubação foi realizado o preparo do inóculo na razão 1:20, ou seja, 500 µL do pré-inóculo foram transferidos para um novo tubo Falcon contendo 9,5 mL de meio TSB fresco. A suspensão bacteriana foi medida no espectrofotômetro antes da incubação na estufa. O inóculo permaneceu na estufa a 37 °C por 4 h, até que a bactéria atingisse a fase *mid-log* de crescimento. Após 4 h de incubação, a suspensão bacteriana foi medida novamente no espectrofotômetro antes de iniciar o ajuste do inóculo para 10^8 UFC/mL. Em seguida, foi realizado o ajuste da suspensão na concentração desejada (10^8 UFC/mL), em espectrofotômetro no comprimento de onda 660 nm.

3.4.2. Microdiluição

Com o inóculo ajustado no meio de cultura líquido, o tubo Falcon foi levado para a centrífuga (3000 rpm - 15 min) para descartar o meio de cultura e ressuspender o *pellet* no tampão *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Para iniciar o ensaio de atividade antimicrobiana dos géis, 0,15 g de cada hidrogel foi transferido para um poço da placa

de 24 poços e, em seguida, 400 μ L do inóculo foram transferidos para os mesmos poços (Fig. 16). As amostras foram homogeneizadas com o auxílio de uma ponteira e permaneceram no escuro por um período de 20 min a temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação, a placa de 24 poços foi levada para a BioTable (Fig. 17), onde foi irradiada no comprimento de onda 660 nm e dose de luz de 50 J/cm² (16 min 40 s).

Figura 16. Poços contendo inóculo de *S. aureus*, suspenso em PBS, homogeneizado nas formulações a serem testadas no escuro e na luz, sendo A: HB; B: HCB; C: HCB/EPP1; D: HCB/AM1; E: HCB/AM2; F: HCB/EPP1/AM1 e G: HCB/EPP1/AM2.



Fonte: Própria.

Figura 17. BioTable em funcionamento, com irradiação de luz vermelha (660 nm – 50 J/cm²).



Fonte: Própria.

Após a irradiação, foram realizadas diluições seriadas (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) transferindo-se 100 μL de cada amostra para o primeiro *ependorf* contendo 900 μL de PBS, e assim sucessivamente para os demais *ependorfs*. Em seguida, foi realizado o plaqueamento de todas as diluições transferindo-se 15 μL de cada diluição para a placa de Petri contendo meio BHI Agar. O plaqueamento foi realizado em triplicata. As placas de Petri foram levadas para a estufa a 37°C por 24 h. Após a incubação, foi realizada a contagem de UFC, e o cálculo de UFC/mL foi realizado utilizando a equação 2. Esse mesmo protocolo também foi realizado para as amostras que permaneceram no escuro por 20 min e que não foram irradiadas.

Cálculo das Unidades Formadoras de Colônia por mililitro:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{média do n}^\circ \text{ de UFC} \times 10^{\text{diluição}}}{\text{volume do plaqueamento}}$$

(Equação 2)

3.4.3. Difusão em ágar

Para realizar o ensaio de difusão de ágar, foram utilizados os hidrogéis liofilizados, cortados no tamanho de 1 cm x 1 cm. Alíquotas de 100 μL da bactéria ajustada a 10^8 UFC/mL, no PBS, foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI). A bactéria foi distribuída pelo meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada e descartável. Após a secagem da bactéria no meio de cultura, os pedaços de filme foram colocados no centro de cada quadrante da placa de Petri. Assim, cada placa foi dividida em 4 quadrantes, e recebeu 4 amostras do mesmo filme, uma em cada quadrante. Para os grupos controle, após a transferência dos filmes as placas foram levadas para a estufa a 37°C por 24 h. Para os grupos irradiados, após a transferência dos filmes as placas foram irradiadas na BioTable, no comprimento de onda 660 nm, com dose de luz de 50 J/cm^2 (16 min 40 s). Ao final do ensaio, todas as placas foram levadas para estufa a 37°C por 24 h. Após a incubação, as placas foram analisadas para observação da formação ou não de halos de inibição. No caso de formação de halo de inibição, os

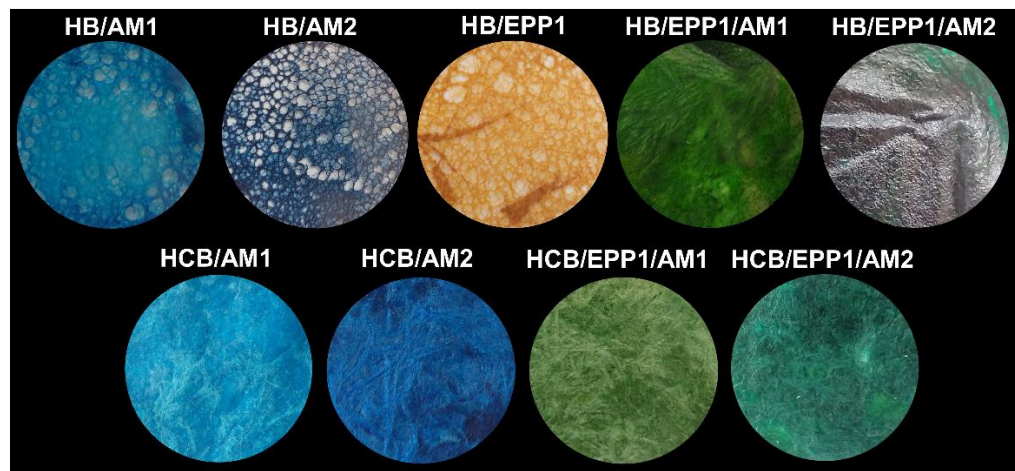
mesmos foram medidos com o auxílio de uma régua e os valores anotados em milímetros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Aspecto macroscópico das formulações contendo AM e EPP-AF®.

A fig. 18 apresenta as características macroscópicas dos hidrogéis liofilizados, segundo sua coloração e aspecto físico.

Figura 18. Aspecto macroscópico das formulações liofilizadas do grupo HB e HCB.



Fonte: Própria.

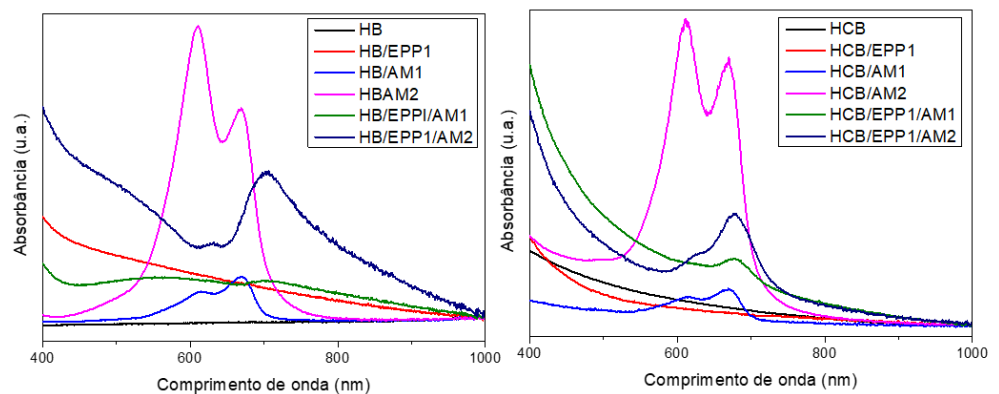
É notável que as formulações do grupo HB contendo AM e EPP-AF® separadamente (HB/AM1, HB/AM2 e HB/EPP1) contêm poros facilmente visíveis macroscopicamente em sua estrutura e apresentam as colorações azul, correspondente ao AM, e amarela, correspondente à própolis, respectivamente. Já naquelas que contêm AM juntamente com EPP-AF® (HB/EPP1/AM1 e HB/EPP1/AM2), os poros não estão visíveis e a coloração verde é resultante da mistura do corante e do extrato de própolis.

Nos hidrogéis do grupo HCB não foi possível observar poros porque, conforme observado por MEV no capítulo 1, as formulações com base em CB possuem poros nanométricos formados entre as redes de nanofibras de celulose, que são vistos somente através de microscopia. A estrutura porosa dos hidrogéis favorece sua aplicação como sistema de liberação de fármacos e permite a geração de oxigênio singlete devido aos espaços contendo ar, o que possibilita o uso das formulações em PDI (ZHANG *et al.*, 2017).

4.2. Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Os espectros de absorção na região do UV-Vis (Fig. 19) mostram que as formulações do grupo HB e do grupo HCB absorvem a luz visível nos mesmos comprimentos de onda, provando que a presença de CB não interfere nesta propriedade. As formulações base HB e HCB não apresentaram bandas de absorção na região do UV-Vis, o que é esperado devido à elevada transparência do hidrogel de Natrosol® (HB) e ao espalhamento de luz provocado pelo alto teor de nanofibras em HCB (LEGNANI *et al.*, 2019).

Figura 19. Espectros de absorção na região do UV-Vis dos grupos HB (esquerda) e HCB (direita).



Fonte: Própria.

Os hidrogéis contendo própolis, HB/EPP1 e HCB/EPP1, também não apresentaram bandas de absorção nesta região do espectro. Pesquisas com extrato etanólico de própolis relatam absorvância máxima em torno de 290 nm, relacionado à absorção dos compostos fenólicos na região do ultravioleta, que ocorre entre 250 e 350 nm (DE LIMA *et al.*, 2016; MALDONADO *et al.*, 2018). No entanto, este comprimento de onda não foi abrangido neste estudo pois para a realização de PDI deve-se levar em consideração a região onde ocorre a absorção máxima do fotossensibilizante, neste caso AM, que absorve na região do vermelho, em aproximadamente 660 nm (TARVIDO *et al.*, 2005).

Para ambos os grupos, as formulações contendo AM apresentaram duas bandas de absorção com máximos centrados em 670 e 610 nm e intensidades

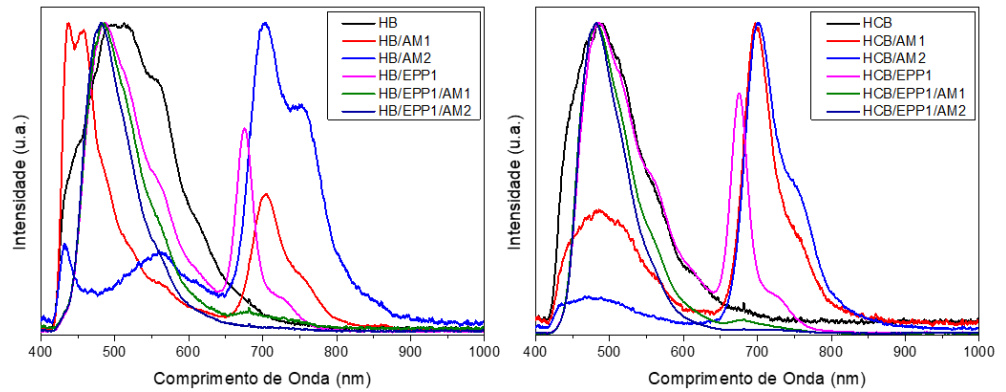
proporcionais à concentração de AM adicionada. No entanto, observa-se uma inversão nos máximos, visto que para HCB/AM1 e HB/AM1 a banda em 670 nm é mais intensa, enquanto que para HCB/AM2 e HB/AM2, é a banda em 610 nm que possui maior intensidade, sugerindo a dimerização de AM. Sabe-se que AM encontra-se em equilíbrio entre suas formas monoméricas e diméricas, as quais apresentam absorvância máxima em torno de 660 nm e 610 nm, respectivamente. Porém, em maiores concentrações existe uma tendência de agregação do corante, levando a um deslocamento do equilíbrio para a formação de dímeros (TARDIVO *et al.*, 2005). Ainda, nos espectros das formulações contendo AM e EPP-AF®, é possível observar que há um discreto deslocamento dos máximos de 670 e 610 para 680 e 620 nm, respectivamente, provavelmente causado pela interação do AM com própolis.

Além das bandas características de absorção, os espectros apresentam uma ascensão a partir de aproximadamente 600 nm, que pode ser devido ao espalhamento da luz pelas amostras e, também, devido aos diferentes tamanhos das moléculas que compõem a própolis, e que absorvem em diferentes regiões do espectro. Dessa forma, ao invés de observamos bandas específicas nas formulações contendo EPP-AF®, vê-se curvas contínuas com tendência de crescimento de absorção conforme diminui o comprimento de onda.

4.3. Espectroscopia de fluorescência

A figura 20 apresenta os espectros de emissão de fluorescência das formulações a partir de excitação em 405 nm.

Figura 20. Espectros de emissão de fluorescência dos grupos HB (esquerda) e HCB (direita).



Fonte: Elaboração própria

Apesar de as formulações do grupo HB apresentarem discretas diferenças nas bandas de emissão de fluorescência em relação grupo HCB, é possível observar duas principais faixas de emissão entre 450 e 550 nm e outra entre 650 e 750 nm, nas regiões do azul/verde e vermelho, respectivamente.

Todas as amostras do grupo HCB apresentaram banda de emissão em torno de 500 nm, presente também nas formulações do grupo HB, com exceção de HB/AM1 e HB/AM2. Estas amostras apresentaram banda em 700 nm, assim como HCB/AM1 e HCB/AM2, sugerindo que a emissão neste comprimento de onda esteja relacionada ao AM. Estudos relatam em seu estado puro, AM emite fluorescência em 680 nm (LI *et al.*, 2015; SELVAM e SARKAR, 2016).

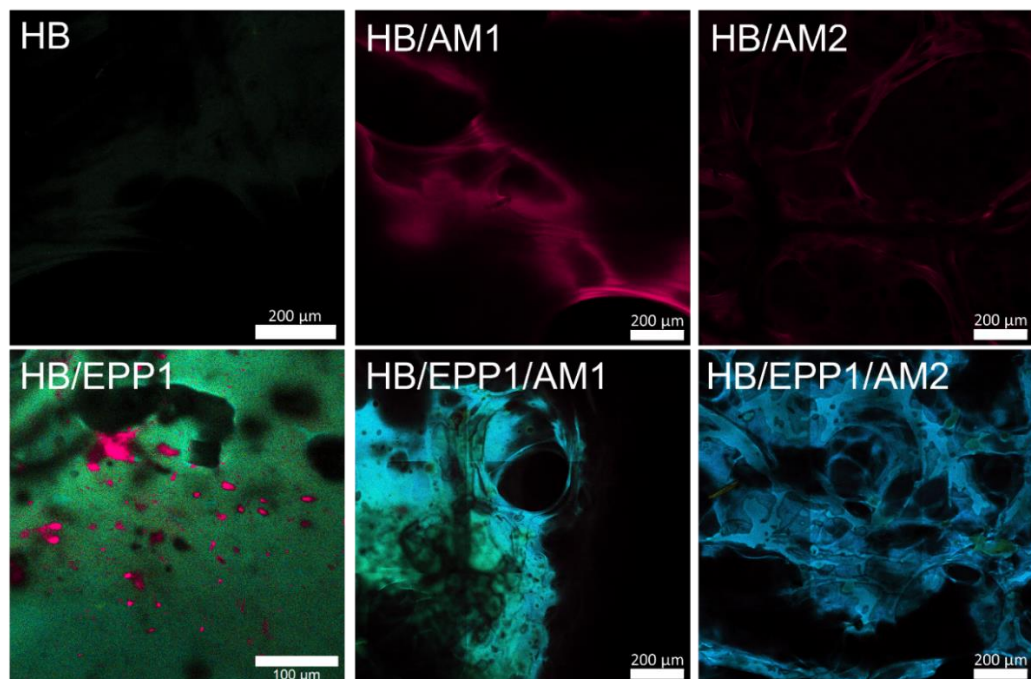
Existe uma banda em 675 nm presente somente nos espectros das formulações contendo EPP-AF®, HB/EPP1 e HCB/EPP1, o que sugere que esta emissão seja atribuída ao extrato de própolis. Esses dados diferem da literatura, visto que foi relatada emissão de fluorescência da própolis em torno de 425 nm (CAMURI *et al.*, 2018). Nas amostras contendo EPP-AF® com AM, a banda em 675 nm aparece de forma bastante discreta e as bandas em torno de 700 nm estão ausentes, o que indica uma provável supressão de fluorescência devido à interação da própolis com AM nos hidrogéis. A fluorescência pode ser utilizada como um indicativo da presença da molécula de FS no local alvo, além de poder ser utilizada para uma melhor

visualização de tecidos danificados, que emitem menores intensidades. Um FS que emita fluorescência em cor diferente da do tecido auxilia na visualização e permite melhores diagnósticos (BUZZA *et al.*, 2015).

4.4. Microscopia Confocal de Fluorescência

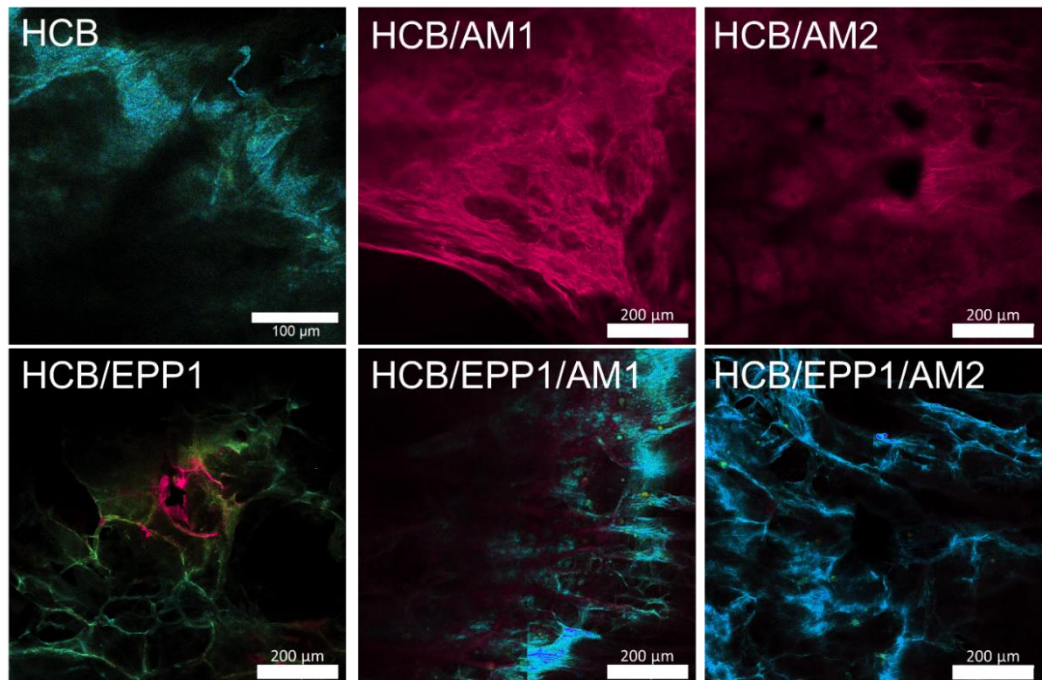
As imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência (Fig. 21 e 22) estão de acordo com os espectros de emissão descritos no item anterior. As formulações contendo AM, tanto do grupo HB como do grupo HCB, apresentaram emissão de fluorescência no vermelho, correspondendo às bandas em torno de 700 nm encontradas nos espectros. As imagens de HCB/EPP1 e HB/EPP1 mostram emissão na região do azul/verde, assim como a presença de alguns pontos com emissão no vermelho, que correspondem às bandas em torno de 500 e 675 nm, respectivamente. Nas imagens das formulações contendo EPP-AF® com AM é predominante a emissão na região do azul, que corresponde à banda em torno de 500 nm.

Figura 21. Imagens de microscopia confocal de fluorescência das formulações do grupo HB.



Fonte: Própria.

Figura 22. Imagens de microscopia confocal de fluorescência das formulações do grupo HCB.



Fonte: Própria.

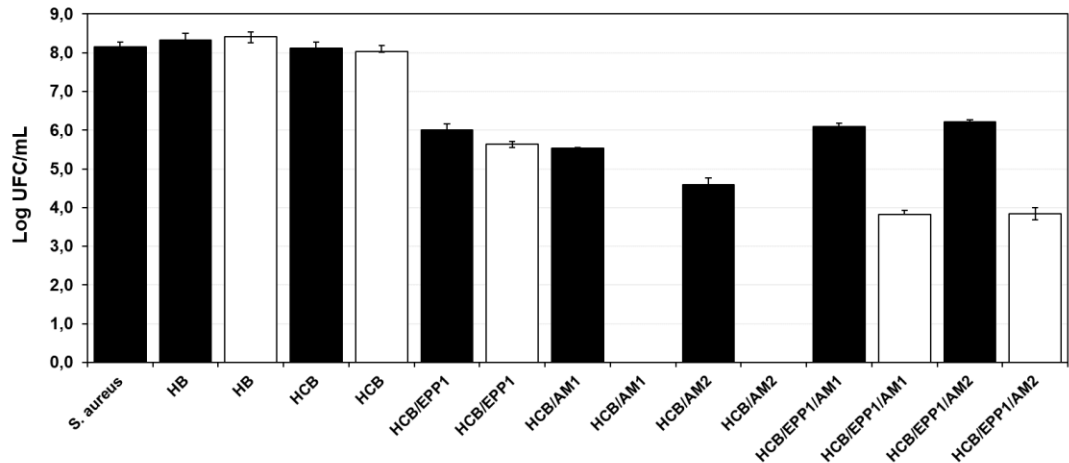
As imagens corroboram o aspecto macroscópico e as imagens de MEV dos hidrogéis, que apresentam espaços porosos em suas estruturas, o que contribui com a realização de PDT/PDI, devido à necessidade da presença de oxigênio para que ocorram as reações fotodinâmicas, e também porque favorecem a incorporação de ativos em sua MATRIZ (ZHANG *et al.*, 2017).

4.5. Ensaio antimicrobiano

4.5.1. Microdiluição

A avaliação da atividade antimicrobiana, realizada pela técnica de microdiluição, mostrou que as formulações contendo AM (HCB/AM1 e HCB/AM2), após 16 minutos de irradiação de luz vermelha em 660 nm, com fluência de 50 J/cm², inibiram totalmente o crescimento da cepa de *S. aureus* testada. Na figura 23 constam os valores, em log UFC/mL, da inibição média de *S. aureus* pelas formulações testadas no escuro e após a exposição à luz.

Figura 23. Inativação de *S. aureus*, em Log UFC/mL, resultado de experimento sem exposição à luz - barras pretas - e após a irradiação de LED vermelho com dose de luz de 50 J/cm² (660 nm) – barras brancas.



Fonte: Própria.

Tanto na presença de luz como no escuro, o efeito antimicrobiano foi mais eficaz nas formulações contendo AM, sem a presença de própolis. Na ausência de luz, HCB/AM1 e HCB/AM2 reduziram o crescimento bacteriano em 2,61 e 3,55 log UFC/mL, respectivamente. Após a irradiação de 50 J/cm² de luz em 660 nm, estas mesmas formulações inativaram totalmente o crescimento de *S. aureus*, comprovando a eficácia dos hidrogéis em PDI.

O hidrogel contendo apenas EPP-AF® apresentou atividade antimicrobiana, com redução de aproximadamente 2,15 log UFC/mL. Sabe-se que a própolis apresenta atividade antimicrobiana principalmente contra microrganismos Gram-positivos, apresentando concentração bactericida mínima significativamente menor para *S. aureus* em relação a bactérias Gram-negativas (DE LIMA *et al.*, 2016).

Porém, as formulações contendo EPP-AF® e AM (HCB/EPP1/AM1 e HCB/EPP1/AM2) mantiveram a inibição em torno de 2 log UFC/ml no escuro, semelhante à HCB/EPP1, enquanto que na luz a inibição foi em torno de 4,30 log UFC/mL. Em relação aos hidrogéis contendo apenas AM, essas amostras demonstraram menor atividade antimicrobiana na presença de luz, e isso pode estar relacionado a uma menor geração de oxigênio singleto causado pelo deslocamento

da absorvância máxima de AM na presença de própolis, que foi demonstrado pelos espectros de UV-Vis. Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, Wang *et al.* (2017) alcançaram um aumento na fototoxicidade da protoporfirina IX (PpIX) ao combiná-la com a própolis através do efeito sinérgico entre elas, o que diminuiu significativamente o volume e massa de tumores em modelo xenográfico.

Para a redução de atividade antimicrobiana de HCB/EPP1/AM1 e HCB/EPP1/AM2, existe a possibilidade de ter ocorrido uma interação entre o azul de metileno, que possui carga positiva (CALIXTO *et al.*, 2016), com as hidroxilas dos compostos fenólicos da própolis, que possuem carga negativa (VOLPI, 2004), causando inativação de alguma substância ativa da própolis. Outra hipótese é de que o próprio oxigênio singleto gerado pelas reações fotodinâmicas tenha reagido com moléculas da própolis que dessa forma, pode ter atuado como um protetor para a bactéria.

Tada *et al.* (2007) relacionaram a diferença na geração de oxigênio singleto por AM com a distribuição do corante pelo microambiente de matrizes de sílicas, que podem ter sequestrado as espécies reativas. No entanto, Peres *et al.* (2016) afirmam que a produção de oxigênio singleto não foi afetada pela compartimentação do fotossensibilizante na matriz de CB. É possível também que a luz tenha sido transmitida com menor eficiência através das formulações contendo EPP-AF®. Isso pode ter ocorrido devido à concentração de própolis utilizada, que preencheu grande parte dos espaços porosos dos hidrogéis, dificultando a transmissão de luz através deles e diminuindo, assim, o efeito fotodinâmico sobre o microrganismo.

Além disso, pode-se observar que sem a presença da luz houve um aumento da inibição bacteriana na formulação contendo maior concentração de AM (HCB/AM2), em relação a de menor concentração (HCB/AM1), comprovando a atividade antimicrobiana do corante no escuro, que já é CONHECIDA (PHOENIX e HARRIS, 2003; LEUNG *et al.*, 2020).

4.5.1. Difusão em ágar

Os resultados do experimento de difusão em ágar estão em conformidade com o de microdiluição, e a tabela 6 apresenta os valores do halo de inibição de

crescimento de *S. aureus*, em experimentos sem exposição à luz, e após irradiação de 50 J/cm² de luz vermelha em 660 nm

Tabela 6. Valores médios dos halos de inibição de *S. aureus* pelas formulações, em experimentos no escuro e no claro (660 nm).

Halo de Inibição (mm) ± DP		
	Escuro	Claro
HB	1,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0
HCB	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
HCB/EPP1	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0
HCB/AM1	3,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1
HCB/AM2	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1
HCB/EPP1/AM1	2,0 ± 0,0	3,0 ± 0,1
HCB/EPP1/AM2	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1

Fonte: Própria.

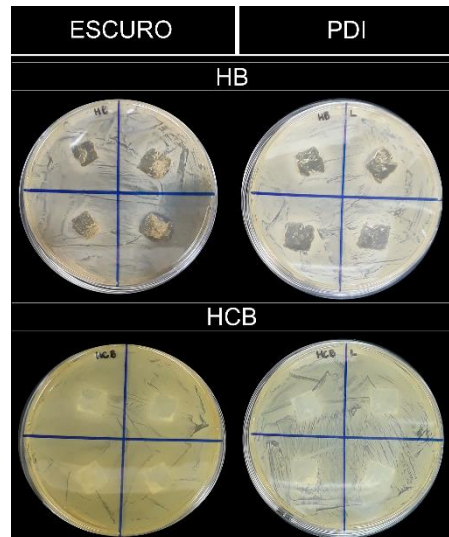
Através da tabela e das figuras 25, 26 e 27, é possível observar que as formulações que apresentaram maior halo de inibição bacteriana foram aquelas contendo AM, sem a presença de própolis (HCB/AM1 e HCB/AM2), assim como no teste de microdiluição. Após exposição à luz, a amostra HCB/AM2 apresentou o maior valor de halo de inibição, em torno de 5 mm, confirmando a eficiência das formulações produzidas contra *S. aureus*.

A eficiência de AM como FS para inativação fotodinâmica de microrganismos já foi demonstrado em diversos estudos e aplicações clínicas, com significativa inibição inclusive de cepas resistentes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (SHEN *et al.*, 2020). Porém, assim como observado no ensaio de microdiluição, quando em presença de própolis, a atividade antimicrobiana do AM é diminuída tanto no escuro quanto após a exposição de luz. Conforme discutido no item anterior, existem algumas hipóteses que podem ter levado a uma diminuição do efeito de AM sobre *S. aureus*.

Não houve diferença nos halos de inibição dos hidrogéis contendo EPP-AF® nos experimentos com luz e no escuro, mantendo em ambos o valor em torno de 3 mm, confirmando a ausência de efeito fotodinâmico da própolis. Mesmo sem a geração de oxigênio singlete, é comprovada sua atividade contra *S. aureus* (PEI *et al.*, 2016; KHOSHNEVISAN *et al.*, 2019). Membranas de CB contendo 1,2 % própolis, assim como as formulações testadas, resultaram em halo de inibição médio de 8 mm para a mesma cepa de *S. aureus* utilizada (ATCC 25923), alcançando halo de 10 mm com 3,6 % de EPP-AF® (BARUD *et al.*, 2013). Ainda em membranas de biocelulose, foram incorporadas microemulsões de EPP-AF® que alcançaram halos de inibição de aproximadamente 23 mm da mesma cepa *S. aureus* testada e também de MRSA, e de aproximadamente 40 mm para *Staphylococcus epidermidis* (MARQUELE-OLIVEIRA *et al.*, 2019).

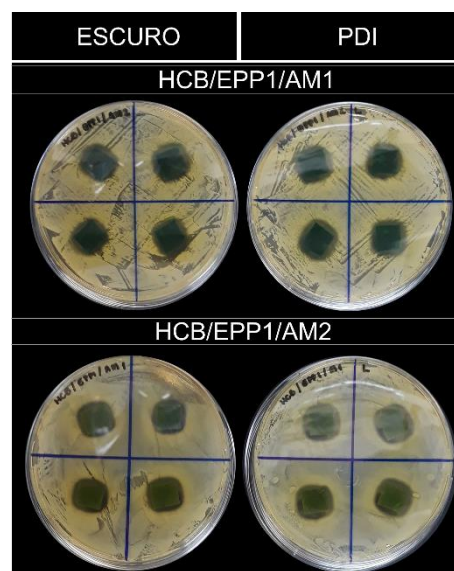
A atividade antibacteriana da própolis é relacionada principalmente à ação dos flavonoides e derivados de ácido cinâmico presentes em sua composição. Diferentes valores de inibição bacteriana são devido às diferenças dos compostos e quantidade de ativos que compõem os extratos (KHOSHNEVISAN *et al.*, 2019). Diferentes extratos de própolis testados apresentaram efeito contra fungos, como do gênero *Candida* e contra bactérias Gram-positivas, mesmo em baixas concentrações, enquanto que para as Gram-negativas, a concentração inibitória mínima foi significativamente maior (UZEL *et al.*, 2005). Provavelmente, este fenômeno está relacionado à diferença na estrutura da parede celular entre estes grupos de microrganismos, cuja composição dificulta a penetração dos ativos nas bactérias Gram-negativas, tornando-as mais resistentes à atividade da própolis (ZEIGHAMPOUR *et al.*, 2017).

Figura 24. Efeito antimicrobiano contra *S. aureus* das bases das formulações, Natrosol® (HB) e biocelulose (HCB), em experimentos no escuro (à esquerda), e após PDI com 50 J/cm² de dose de luz em 660 nm, à direita.



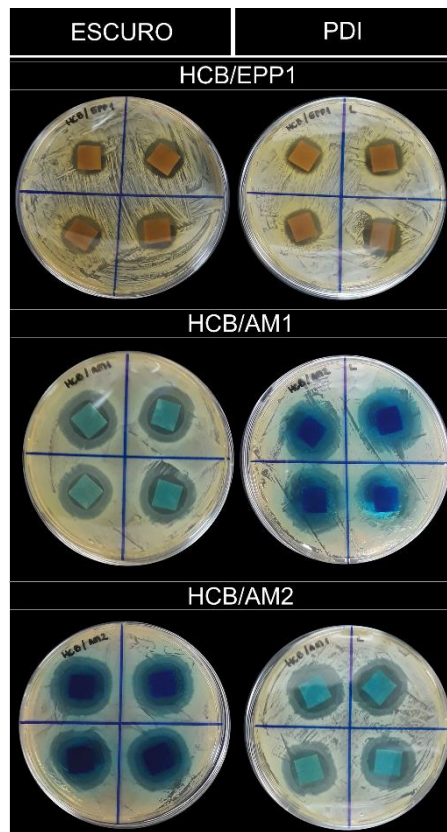
Fonte: Própria.

Figura 25. Efeito antimicrobiano contra *S. aureus* das bases das formulações, Natrosol® (HB) e biocelulose (HCB), em experimentos no escuro (à esquerda), e após PDI com 50 J/cm² de dose de luz em 660 nm, à direita.



Fonte: Própria.

Figura 26. Efeito antimicrobiano contra *S. aureus* das formulações à base de CB contendo 1,2 % de EPP-AF® (HCB/EPP1), 0,01 % de AM (HCB/AM1) e 0,1 % de AM (HCB/AM2) em experimentos no escuro (à esquerda), e após PDI com 50 J/cm² de dose de luz em 660 nm, à direita



Fonte: Própria.

5. CONCLUSÕES PARCIAIS DO CAPÍTULO 2

Os espectros de UV-Vis das novas formulações produzidas demonstraram duas bandas de absorbância de AM, com máximos em 670 e 610 nm, sugerindo a presença das formas diméricas do corante. Em presença de própolis, essas bandas foram ligeiramente deslocadas para 680 e 620 nm, respectivamente, confirmando a ocorrência de interações entre EPP-AF® e AM. Resultados de espectroscopia de fluorescência demonstraram essa interação através da sobreposição de bandas de emissão de fluorescência da própolis e AM, com predominância de emissão da própolis em torno de 500 nm e supressão de bandas em torno de 700 nm, corroborando o que foi observado por microscopia confocal de fluorescência. Além disso, as imagens de microscopia confocal evidenciam a estrutura porosa dos hidrogéis, favorável para a ocorrência de reações fotodinâmicas. Com exceção dos hidrogéis base, HB e HCB, todas as formulações foram capazes de inibir em diferentes quantidades o crescimento de *S. aureus*. Os hidrogéis contendo AM e própolis apresentaram menor atividade antibacteriana em relação àqueles contendo AM puro, que foi capaz de inibir totalmente o crescimento da bactéria após exposição à luz (50 J/cm², 660 nm). Os resultados são favoráveis à aplicação dos hidrogéis na prevenção ou contenção de infecções mesmo sem a presença da luz, porém sua atividade é eficientemente intensificada em experimentos fotodinâmicos, demonstrando seu grande potencial em PDI aplicada ao tratamento de feridas infectadas, crônicas e de difícil cicatrização.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os hidrogéis de biocelulose contendo EPP-AF®, produzidos neste trabalho, apresentaram devida incorporação da própolis na matriz de CB, cuja estrutura em rede tridimensional de nanofibras foi mantida, mesmo após a trituração das membranas de celulose e adição dos componentes nas formulações. O estudo de FITR confirmou esta incorporação através da presença de bandas características da própolis nos espectros dos hidrogéis contendo o extrato. Os resultados de análise térmica dessas formulações demonstraram um comportamento térmico intermediário entre o hidrogel base de CB (HCB) e EPP-AF® puros, confirmando que não houve mudança considerável de estabilidade térmica. De acordo com o estudo reológico, as amostras se comportaram como materiais pseudoplásticos e tixotrópicos, se mostrando adequadas para aplicação tópica, visto que esta característica determina um melhor espalhamento da formulação sobre a pele, evitando seu escoamento.

No que se refere ao perfil cromatográfico da própolis, foram encontrados três importantes biomarcadores de EPP-AF® nos hidrogéis: ácido *p*-cumárico, bacarina e Artepelin C, estando este último em maior quantidade, assim como esperado. O estudo de liberação, realizado por células de Franz, demonstrou que o ácido *p*-cumárico foi liberado dos sistemas mais rapidamente em relação ao Artepelin C. No entanto, ambos mantiveram a liberação por no mínimo 20 h, o que pode ser favorável para aplicação em tratamento de feridas. Por fim, nenhuma amostra apresentou mutagenicidade pelo Teste de Ames.

A partir destes resultados, novos hidrogéis de biocelulose contendo própolis e azul de metileno foram produzidos visando o estudo da inativação fotodinâmica. A caracterização dessas novas formulações por espectroscopia na região do UV-Vis demonstrou um discreto deslocamento na absorvância máxima de AM em presença de própolis, bem como formação de dímeros de AM nas amostras mais concentradas. Os espectros de fluorescência das formulações contendo EPP-AF® e AM se apresentaram de acordo com os resultados de microscopia confocal de fluorescência, em que houve predominância de emissão de fluorescência da própolis em aproximadamente 500 nm, e supressão das bandas em torno de 700 nm. Ainda, as

imagens de microscopia confocal revelaram a estrutura porosa dos hidrogéis, o que favorece a ocorrência de reações fotodinâmicas.

Com exceção dos hidrogéis base HB e HCB, todas as formulações contendo própolis e/ou AM apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* em ensaios de microdiluição e difusão em ágar. A inibição de AM foi menor quando em presença de própolis, porém todas as amostras obtiveram resultados favoráveis, no que se refere a um hidrogel que possa prevenir ou conter infecções. Além disso, as formulações contendo AM foram capazes de inibir totalmente o crescimento de *S. aureus* em experimentos com exposição à luz (50 J/cm², 660nm), indicando grande potencial dos hidrogéis para aplicação em PDI visando tratamento de feridas.

As perspectivas deste trabalho incluem a realização do estudo de atividade antimicrobiana com diferentes combinações de EEP-AF® e AM, com objetivo de elucidar os mecanismos propostos para o comportamento do corante na presença de própolis sobre a bactéria; avaliação da liberação de AM das formulações; verificação *in vitro* da atividade cicatrizantes dos hidrogéis, em presença e ausência de luz; e, por fim, estudos pré-clínicos e clínicos.

REFERÊNCIAS

- AHN, J.-C.; BISWAS, R.; CHUNG, P.-S. **Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 10, p. 236-243, 2013.
- ALMEIDA-JUNIOR, S. de; PEREIRA, D. V.; FERREIRA, T. M.; FREITAS, R. A.; SILVA, C. C.; SANTOS, M. F. C. **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of kaempferide from the Brazilian green propolis.** Research, Society and Development, v. 9, n. 10, 2020.
- AMOROS, M.; SIMOES, C. M. O.; GIRRE, L. **Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture.** Comparison with the antiviral activity of propolis. Journal of Natural Products, v. 55, n. 12, p. 1732-1740, 1992.
- AQUINO-JÚNIOR, A. E.; CARBINATTO, F. M.; BAGNATO, V. S.; **Feridas: um desafio para a saúde pública.** São Carlos: Instituto de Física de São Carlos – IFSC, 2019.
- ARRUDA, C.; RIBEIRO, V. P.; ALMEIDA, M. O.; MEJÍA, J. A. A.; CASOTI, R.; BASTOS, J. K. **Effect of light, oxygen and temperature on the stability of artemillin C and *p*-coumaric acid from Brazilian green propolis.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 178, 2019.
- BAPTISTA, N. U. F. **Estudo da composição físico-química e antibacteriana de diferentes própolis e avaliação em cultura de células eucarióticas.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2016.
- BARROS, M. P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. de. **Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis.** Journal of Ethnopharmacology, v. 120, p. 372-377, 2008.
- BARUD H. S.; RIBEIRO C. A.; CRESPI, M. S.; MARTINES, M. A. U.; DEXPERT-GHYS, J.; MARQUES, R. F. C.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. **Thermal characterization of bacterial cellulose–phosphate composite membranes.** Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, v. 87, n. 3, p. 815-818, 2007.
- BARUD, H. G. O.; SILVA, R. R.; BARUD, H. S.; TERCJAK, A. GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; OLIVEIRA JUNIOR, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. **A multipurpose natural and renewable Polymer in medical applications: bacterial cellulose.** Carbohydrate Polymers, v. 153, p. 406-420, 2016.

BARUD, H. S. BARRIOS, C.; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C.; VERELST, M.; DEXPERT-GHYS, J. MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. **Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes**. *Materials Science & Engineering C*, v. 28, p. 515-518, 2008.

BARUD, H. S. **Novos Materiais Multifuncionais Baseados em Celulose Bacteriana**. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara - SP, 2010.

BARUD, H. S.; ARAÚJO JUNIOR, A. M.; SASKA, S.; MESTIERI, L. B.; CAMPOS, J. A. D. B.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, N. U.; NASCIMENTO, P. A.; MIGUEL, F. G.; VAZ, M. M. O. L. L.; BARIZON, E. A.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; GASPAR, A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BERRETTA, A. A. **Antimicrobial brazilian propolis (EPP-AF®) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. **An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test**. *Mutation Research*, v. 97, n. 4, p. 267–281, 1982.

BERRETTA, A. A.; CASTRO, P. A. de; CAVALHEIRO, A. H.; FORTES, V. S.; BOM, P. V.; NASCIMENTO, A. P.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; PEDRAZZI, V.; RAMALHO, L. N. Z.; GOLDMAN, G. H. **Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Hindawi Publishing Corporation, v. 2013; 2013.

BERRETTA, A. A.; NASCIMENTO, A. P.; BUENO, P. C. P.; VAZ, M. M. O. L. L.; MARCHETTI, J. M. **Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds**. *International Journal of Biological Sciences*, v. 8, n. 4 (512-521), 2012.

BERRETTA, A. A.; SILVEIRA, M. A. D.; CAPCHA, J. M. C. **Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease**. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131, 2020.

BEZERRA, C. R. F.; BORGES, K. R. A.; ALVES, R. N. S.; TELES, A. M.; RODRIGUES, V. P.; SILVA, M. A. C. N. da; NASCIMENTO, M. D. S. B.; BEZZERRA, G. F. B. **Highly eficiente antibiofilm and antifungal activity of green propolis against *Candida* species in dentistry material**. *bioRxiv*, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2020.01.27.920959>; Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

BHARGAVA, P.; GROVER, A.; NIGAM, N.; KAUL, A.; DOI, M.; ISHIDA Y.; KAKUTA, H.; KAUL, S. C.; TERAOKA, K.; WADHWA, R. **Anticancer activity of the supercritical extract of Brazilian green propolis and its active component, artemillin C:**

bioinformatics and experimental analyses of its mechanisms of action.

International Journal of Oncology, v. 52, p. 925-932, 2018.

BIODERMS, 2018. **What are the stages of wound healing?** 2018. Disponível em: What are the Stages of Wound Healing? | Biodermis.com. Acesso em: 17 de setembro de 2020.

BOATENG, J.; CATANZANO, O. **Advanced therapeutic dressings for effective wound healing - a review.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 104, n. 11, p. 3653–3680, 2015.

BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; AMSTRONG, D. G. **Wound microbiology and associated approaches to wound management.** American Society for Microbiology. Clinical Microbiology Reviews, p. 244-269, 2001.

BRITISH COLUMBIA PROVINCIAL NURSING SKIN AND WOUND COMITEE. **Guideline: assessment and treatment of wound infection.** 2017. Disponível em: <https://www.clwk.ca/buddydrive/file/guideline-wound-infection-2017-january/>. Acesso em: 14 de setembro de 2020.

BUZZA, H. H.; STRINGASCI, M. D.; PRATAVIEIRA, S.; GRECCO, C.; VOLLET-FILHO, J. D.; ZANCHIN, A. L. **Lince: instrumentação brasileira para a aplicação da terapia fotodinâmica.** In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015.

CACIEDO, M. L.; CASTRO, C. M.; SERVETAS, I.; BOSNEA, L.; BOURA, K.; TSAFRAKIDOU, P.; DIMA, A.; TERPOU, A.; KOUTINAS, A.; CASTRO, G. R. **Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications.** Bioresource Technology, v. 213, p. 172-180, 2016.

CALIXTO, G. M. F.; BERNEGOSSI, J.; FREITAS, L. M.; FONTANA, C. R.; CHORILLI, M. **Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review.** Molecules, v. 21, n. 342, 2016.

CAMPOS, A. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. **Cicatrização de feridas.** ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva, v. 20, n. 1, p. 51–8, São Paulo, 2007.

CAMPOS, J. V.; ASSIS, O. B. G.; BERNERDES-FILHO, R. **Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*.** Food Science and Technology, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2020.

CAMURI, I. J.; COSTA, A. B.; ITO, A. S.; PAZIN, W. M. **Optical absorption and fluorescence spectroscopy studies of Artepillin C, the major component of green propolis.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018.

- CAO, X-P.; CHEN, Y-F.; ZHANG, J-L.; YOU, M-M.; WANG, K.; HU, F-L. **Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity.** *Phytomedicine*, v. 34, p. 76-84, 2017.
- CARBINATTO, F. M.; SÁBIO, R. M.; MENEGUIN, A. B.; CESTARI, S. E.; CRUZ, S. A.; BARUD, H. S. **Bacterial cellulose-based hydrogel for wound healing: characterization and in vitro evaluation.** *International Journal of Advances in Medical Biotechnology*, v. 1, n. 2, 2018.
- CARVALHO, F. C.; CALIXTO, G.; HATEKEYAMA, I. N.; LUZ, G. M.; DAFLON, M. P.; CHORILLI, M. **Rheological, mechanical, and bioadhesive behavior of hydrogels to optimize skin delivery systems.** *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 39, n. 11, p. 1750-1757, 2012.
- CASTRO, P. A. de; SAVOLDI, M.; BONATTO, D.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, M. H.; BERRETTA, A. A.; GOLDMAN, G. H. **Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to propolis.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.12, n. 194, 2012.
- CAUICH-KUMUL, R.; CAMPOS, M. R. S. **Bee Propolis: Properties, Chemical Composition, Applications, and Potential Health Effects.** Em: *Bioactive Compounds – Health Benefits and Potencial Applications*, cap. 12, p. 227-243, 2019.
- CAVALCANTI, L. M.; PINTO, F. C. M.; OLIVEIRA, G. M.; LIMA, S. V. C.; AGUIAR, J. L. A.; LINS, E. M. **Efficacy of bacterial cellulose membrane for the treatment of lower limbs chronic varicose ulcers: a randomized and controlled trial.** *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 44 (72-80), 2017.
- CHANG, W.-S.; CHEN, H.-H.; **Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings.** *Food Hydrocolloids*, v. 53 (75-83), 2016.
- COELHO, V. H. M.; ALVARES, L. D.; CARBINATTO, F. M.; AQUINO-JUNIOR, A. E.; ANGARITA, D. P. R.; BAGNATO, V. S. **Photodynamic therapy, laser therapy and cellulose membrane for the healing of venous ulcers: results of a pilot study.** *Journal of Nursing and Care*, 6, 2, 2017.
- COLLIER, M. **Recognition and management of wound infections.** *World Wide Wounds*, United Lincolnshire Hospitals. 2004. Disponível em: <http://www.worldwidewounds.com/2004/january/Collier/Management-of-Wound-infections.html>. Acesso em: 22 de janeiro de 2019.
- CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. **Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, 2005.

COSTA, P.; ALMEIDA, M. O.; LEMOS, M.; ARRUDA, C.; CASOTI, R.; SOMENSI, L.B.; BOEING, T.; MARIOTT, M.; SILVA, R. C. M. V. A. F. da; STEIN, B. P.; SOUZA, P. de; SANTOS, A. C. dos; BASTOS, J. K.; SILVA, L. M. da; ANDRADE, S. F. **Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action.** Journal of Ethnopharmacology, v. 226, p. 82-89, 2018.

CUSINATO, D. A. C.; MARTINEZ, E. Z.; CINTRA, M. T. C.; FILGUEIRA, G. C. O.; BERRETTA, A. A.; LANCHOTE, V. L.; COELHO, E. B. **Evaluation of potential herbal-drug interactions of a standardized propolis extract (EPP-AF®) using an in vivo cocktail approach.** Journal of Ethnopharmacology, v. 245, 2019.

CUTTING, K. F.; WHITE, R. J. **Criteria for Identifying Wound Infection.** British Journal of Community Nursing, v. 51, p. 28-34, 2005.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN J.R., MALCOLM R. **Microbial cellulose- the natural power to heal wounds.** Biomaterials, v. 27, p. 145-151, 2006.

CZAJA, W.; YOUNG, J. D.; KAWECKI, M.; BROWN JR., M. **The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications.** American Chemical Society, v. 8, n. 1, 2007.

DAYAL, M. S.; GOSWAMI, N.; SAHAI, A.; JAIN, V.; MATHUR, G.; MATHUR, A. **Effect of media components on cell growth and production from *Acetobacter* MTCC 2623.** Carbohydrate Polymers, v. 94, p. 12-16, 2013.

DIAS, L. D.; BAGNATO, V. S. **An update on clinical photodynamic therapy for Fighting respiratory tract infections: a promising tool against COVID-19 and its co-infections.** Laser Physics Letters, 17, 2020.

DINIZ, D. P.; LORENCINI, D. A.; BERRETTA, A. A.; CINTRA, M. A. C. T.; LIA, E. N.; JORDÃO JR, A. A.; COELHO, E. B. **Antioxidant effect of Standardized Extract of Propolis (EPP-AF®) in healthy volunteers: a “before and after” clinical study.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi, v. 2020, 2020.

EBADI, P.; FAZELI, M. **Evaluation of the potential *in vitro* effects of propolis and honey on wound healing in human dermal fibroblasts cells.** South Africa Journal of Botany, v. 137, p. 414-422, 2021.

FERNANDES, J. P. S.; SAVINO, G.; AMARANTE, A. C. G. **Estudo das relações entre estrutura e atividade de parabenos: uma aula prática.** Química Nova, v. 36, n. 6, p. 890-893, 2013.

FONTES, M. L.; MENEGUIN, A. B.; AGNIESZKA, T. G.; GUTIERREZ, J.; CURY, B. S. F.; SANTOS, A. M.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H; S. **Effect of *in situ***

modification of bacterial cellulose with carboxymethylcellulose on its nano/microstructure and methotrexate release properties. Carbohydrate Polymers, v. 179, p. 126-134, 2018.

FUJIMOTO, G. **Própolis Verde: caracterização, potencial de atividade antimicrobiana e efeitos sobre biofilmes de *Enterococcus* spp.** Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2016.

GONG, T.; HOU, Y.; YANG, X.; GUO, Y. **Gelation of hydroxyethyl cellulose aqueous solution induced by addition of colloidal silica nanoparticles.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 134, p. 547-556, 2019.

GÜRGEN, M. **Excess use of antibiotics in patients with non-healing ulcers.** European Wound Management Association, Dinamarca, v. 14, n. 1, p. 17-22, 2014.

HAMBLIN, M. R. **Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes.** Current Opinion in Microbiology, v. 33, p. 67–73, 2016.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. **Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease.** Photochemistry and photobiological Sciences, v. 3, n. 5, p. 436–450, 2004.

HEALEY, B.; FREEDMAN, A. **Infections.** ABC of Wound Healing – British Medical Journal, 332, p. 838-841, 2006.

HORI, J. I.; ZAMBONI, D. S.; CARRÃO, D. B.; GOLDMAN, G. H.; BERRETTA, A. A. **The inhibition of inflammasome by Brazilian propolis (EPP-AF).** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Publishing Corporation, v. 2013; 2013.

HOZZEIN, W. N.; BADR, G.; GHAMDI, A. A. AI; SAYED, A.; AL-WAILI, N. S.; GARRAUD, O. **Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting TGF-Beta/Smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model.** Cellular Physiology and Biochemistry, v. 37, p. 940-954, 2015.

HUANG, L.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. **Antimicrobial Photodynamic Inaction and Photodynamic Therapy for Infections.** Methods in Molecular Biology, v. 635, p. 155-173, 2010.

HUANG, X.; BRAZEL, C. S. **On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems.** Journal of Controlled Release, v. 73, p. 121,136, 2001.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. **Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação icnográfica.** Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 85, n.4, p. 501-511, 2010. Disponível em: [mhttp://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011](http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011). Acesso em: 11 de dezembro de 2019.

KHOSHNEVISAN, K.; MALEKI, H.; SAMADIAN, H.; DOOSTAN, M.; K, M. R. **Antibacterial and antioxidant assessment of cellulose acetate/polycaprolactone nanofibrous mats impregnated with propolis.** International Journal of Biological Macromolecules, 140, 1260-1268, 2019.

KLEMM, D., SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. **Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery.** Progress in Polymer Science, v. 26, p. 1561-1603, 2001.

KLEMM, D.; CRANSTON, E. D.; FISCHER, D.; GAMA, M.; KEDZIOR, S. A.; KRALISCH, D.; KRAMER, F.; KONDO, T.; LINDSTRÖM, T.; NIETZSCHE, S.; PETZOLD-WELCKE, K.; RAUCHFUß, F. **Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: today's state.** Materials Today, v. 21, n. 7, p. 720-748, 2018.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H-P, BOHN, A. **Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material.** Polymer Science, Weinheim, v. 44, (3358-3393), 2005.

KUROPATNICKI, A. K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. **Historical aspects of propolis research in modern times.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/964149>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2019.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M. **Cicatrização de feridas.** Educação Médica Contínua, v. 69, n. 3, Portugal, 2011.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. **Thixotropic property in pharmaceutical formulations.** Journal of Controlled Release, v. 136, p. 88-98, 2009.

LEGNANI, C.; BARUD, H. S.; CAIUT, J. M. A.; CALIL, V. L.; MACIEL, I. O.; QUIRINO, W. G.; RIBEIRO, S. J. L.; CREMONA, M. **Transparent bacterial cellulose nanocomposites used as substrate for organic light-emitting diodes.** J. Mater. Sci.: Mater. Electron., 2019.

LEUNG, B.; DHARMARATNE, P.; YAN, W.; CHAN, B. C. L.; LAU, C. B. S.; FUNG, K.P.; IP, M.; LEUNG, S. S. Y. **Development of thermosensitive hydrogel containing methylene blue for topical antimicrobial photodynamic therapy.** Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 203, 2020.

LI, L.; LIU, J.; YANG, X.; PENG, Z.; XU, J.; TANG, J.; HE, X.; WANG, K. **Quantum dot/ methylene blue FRET mediated NIR fluorescent nanomicelles with large**

Stocks shift for bioimaging. Chemical Communication, v. 51, p. 14357-14360, 2015.

LIMA, G. G. de; SOUZA, R. O.; BOZZI, A. D.; POPLAWSKA, M. A.; DEVINE, D. M.; NUGENT, M. J. D. **Extraction method plays critical role in antibacterial activity of propolis-loaded hydrogels.** Journal of Pharmaceuticals Sciences, p. 1-10, 2016.

LUCENA, M. T.; MELO JÚNIOR M. R.; LIRA, M. M.; CASTRO, C. M. M. B.; CAVALCANTI, L. A.; MENEZES, M. A.; PINTO, F. C. M.; AGUIAR, J. L. A. **Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2015.

LUSTRI, R. W.; BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S.; PERES, M. F. S.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. **Microbial cellulose – biosynthesis mechanisms and medical applications.** Em: POLETTO, Matheus. Cellulose – Fundamental Aspects and Current trends, Brasil, Intech, cap. 6, 2015.

MACHADO, A. E. H. **Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas.** Química Nova, v. 23, n. 2, p.237-243, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422000000200015>. Acesso em: 25 de janeiro de 2019.

MACHADO, J. L.; ASSUNÇÃO, A. K. M.; SILVA, M. C. P.; REIS, A. S.; COSTA, G. C.; ARRUDA, D. S.; ROCHA, B. A.; VAZ, M. M. O. L. L.; PAES, A. M. A.; GUERRA, R. N. M.; BERRETTA, A. A.; NASCIMENTO, F. R. F. **Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawl Publishing Corporation, v. 2012, 2012.

MACHADO, R. T. A.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK A.; TROVATTU, E.; UAHIB, F. G. M.; NASCIMENTO, A. P.; BERRETTA, A. A.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S. **Komagateibacter rhaeticus as an alternative bacteria for cellulose production.** Carbohydrate Polymers, v. 152, p. 841-849, 2016.

MALDONADO, L.; MARCINKEVICIUS K.; BORELLI, R.; GENNARI G.; SALOMÓN, V.; ISLA, M. I.; VERA, N.; BORELLI, N. **Differentiation of argentine propolis from different species of bees and geographical origins by UV spectroscopy and chemometric analysis.** Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2018.

MARON, D.M.; AMES, B.N. **Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test.** Mutation Research, Elsevier, v. 113, p. 173 – 215, 1983.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; BARUD, H. S.; TORRES, E. C.; MACHADO, R. T. A.; CAETANO, G. F.; LEITE, M. N.; FRADE, M. A. C.; RIBEIRO, S. J. L.; BERRETTA, A. A. **Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-**

microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. International Journal of Biological Macromolecules, v. 136, p. 570-578, 2019.

MOHAMMADKAZEMI, F.; MEHRDAD A.; ALIREZA A. **Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media.** Carbohydrate Polymers, v. 117, p. 518-523, 2015.

MOMEKOVA, D.; IVANOV, E.; KONSTANTINOV, S.; UBLEKOV, F.; PETROV, P. D. **Nanocomposite cryogel carriers from 2-hydroxyethyl cellulose network and cannabidiol-loaded polymeric micelles for sustained topical delivery.** Polymers, v. 12, 2020.

MORIYAMA, L. T.; GRECCO, C. **Instrumentações básicas.** In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015.

MORTELMANS, K., ZEIGER, E. **The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay.** Mutation Research, Elsevier, v. 455, p. 29 – 60, 2000.

NESI-REIS, V.; LERA-NONOSE, D. S.S.L.; OYAMA, J.; SILVA-LALUCCI, M. P.P.; DEMARCH, I. G.; ARISTIDES, S. M.A.; TEIXEIRA, J. J.V.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V.C. **Contribution of photodynamic therapy in wound healing: a systematic review.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 21, p. 295-305, 2017.

NITSCHKE, M. J. T. **Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar.** 63 f. Tese (Doutorado em Biologia de parasitas e microrganismos) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu. 2010.

OLIVEIRA, K. T.; INADA, N. M.; SILVA, A. P.; CARBINATTO, F. M. **Fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica.** In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015.

OLIVEIRA, R. N.; MCGUINNESS, G. B.; ROUZE, R.; QUILTY, B.; CAHILL, P.; SOARES, G. D. A.; THIRÉ, R. M. S. M. **PVA hydrogels loaded with a Brazilian propolis for burn wound healing applications.** Journal of Applied Polymer Science, 2015.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. **Potential role of propolis in wound healing: biological properties and therapeutic activities.** Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 98, p. 469-483, 2018.

PACHECO, G.; NOGUEIRA, C. R.; MENEGUIN, A. B.; TROVATTI, E.; SILVA, M. C. C.; MACHADO, R. T. A.; RIBEIRO, S. J. L.; SILVA FILHO, E. C.; BARUD, H. S. **Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew**

tree residues as alternative carbon source. *Industrial Crops and Products*, v. 107, p. 13-19, 2017.

PANG, L.; GAO, Z.; FENG, H.; WANG, S.; WANG, Q. **Cellulose based materials for controlled release formulations of agrochemicals: a review of modifications and applications.** *Journal of Controlled Release*, v. 316, p. 105-115, 2019.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. **Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. **Chemical constituents in *Bacharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 25, p. 1100-1103, 2004.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. **Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis.** *European Journal of Pharmacology*, v. 572, p. 296-301, 2008.

PAULINO, N.; TEIXEIRA, C.; MARTINS, R.; SCREMIN, A.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; ABREU, S. R. L.; CASTRO, S. L. MARCUCCI, M. **Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis.** *Planta Med*, v. 72, p. 899-906, 2006.

PECORARO, E.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. **Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications.** *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 1 ed, p. 369-383, 2008.

PEI, K.; OU, J.; HUANG, J.; OU, S. ***p*-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities.** *Society of Chemical Industry*, 96, p. 2952-2962, 2016.

PEREIRA, A., S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** *Química Nova*, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PERES, M. F. S.; NIGOGHISSIAN, K.; PRIMO, F. L.; SASKA, S.; CAPOTE, T. S. O.; CAMINAGA, R. M. S.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L.; TEDESCO, A. C. **Bacterial cellulose membranes as a potential drug delivery system for photodynamic therapy of skin cancer.** *J Braz. Chem. Soc.*, v. 27, n. 11, p. 1949-1959, 2016.

PERUSSI, J. R. **Inativação fotodinâmica de microrganismos**. Química Nova, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PETER, C. M.; PICOLI, T.; LATOSINSKI, M. L.; VARGAS, G. D.; HÜBNER, S. O.; FISCHER, G. **Atividade antiviral virucida de extratos hidroalcoólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV)**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 37, n. 7, p. 667-675, 2017.

PHOENIX, D. A.; HARRIS, F. **Phenothiazinium-based photosensitizers: antibacterial of the future?** Trends in Molecular Medicine, v. 9, n. 7, p. 283-285, 2003.

PINA, G. M. S.; LIA, E. N.; BERRETTA, A. A.; NASCIMENTO, A. P.; TORRES, E. C.; BUSZINSKI, A. F. M.; CAMPOS, T. A. de; COELHO, E. B.; MARTINS, V. P. **Efficacy of própolis on the denture stomatitis treatment in older adults: a multicentric randomized trial**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindaw, v. 2017; 2017.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R.T.; CARVALHO, L. B.; **Propriedades, usos e aplicações da própolis**. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 8 (3), p. 76-100, 2011.

PLAETZER, K.; BERNEBURG, M.; KIESSLICH, T.; MAISCH, T. **New applications of photodynamic therapy in biomedicine and biotechnology**. BioMed Research Internation. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3684020/> Acesso em: 29 de janeiro de 2019.

PÖTZINGER, Y.; KRALISCH, D.; FISCHER, D. **Bacterial nanocellulose: the future of controlled drug delivery?** Therapeutic Delivery, v. 8, n. 9, p. 753-761, 2017.

PRATAVIEIRA, S.; CORRÊA, T. Q.; ONO, B.; KURACHI, C. **História da terapia fodotínâmica**. In: Terapia Fotodinâmica Dermatológica: Programa TFD Brasil. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2015.

QUINTINO, R. L.; REIS, A. C.; FERNANDES, C. C.; MARTINS, C. H. G.; COLLI, A. C.; CROTTI, A. E. M.; SQUARISI, I. S.; RIBEIRO, A. B.; TAVARES, D. C.; MIRANDA, M. L. D. **Brazilian green própolis: chemical composition of essential oil and their in vitro antioxidant, antibacterial and antiproliferative activities**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 63, 2020.

RADOVANOVIC, V.; VLAINIC, J.; HANZIC, N.; UKIC, P.; ORSOLIC, N.; BARANOVIC, G.; JEMBREK, M. J. **Neurotoxic effect of ethanolic extract of propolis in the presence of copper ions is mediated through enhanced production of ROS and stimulation of caspase-3/7 activity**. Toxins, v. 11, 2019.

RESENDE, F. A.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; TAVARES, D. C.; BASTOS, J. K.; SILVA FILHO, A. A.; VARANDA, E. A. **Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test.** *Molecules*, v. 17, p. 2335-2350, 2012.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. **Antigenotoxicity and mutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source determined by *Allium cepa* test system.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 2., p. 257-269, 2016.

ROCHA, B. A.; RODRIGUES, M. R.; BUENO, P. C. P.; COSTA-MACHADO, A. R. M.; VAZ, M. M. O. L. L.; NASCIMENTO, A. P.; BARUD, H. S.; BERRETTA-SILVA, A. A. **Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: increased water solubility of the chemical constituents and antioxidant activity.** *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 108, p. 87-94, 2012.

SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGRUJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. **Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film.** *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers*, v. 22, p. 1194-1199, 2006.

SANTOS, L. B. M. **Aplicação de zinco-porfirina e azul de metileno em gel e avaliação para uso em terapia fotodinâmica**, 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife-PE, 2016.

SANTOS, P. B. R. E. dos; ÁVILA, D. S.; RAMOS, L. P.; YU, A. R.; SANTOS, C. E. R.; BERRETTA, A. A.; CAMARGO, S. E. A.; OLIVEIRA, J. R. de; OLIVEIRA, L. D. de. **Effects of Brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilm of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.** *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, v. 36, p. 834-845, 2020.

SANTOS, W., C. R.; BARBOSA, C. D.; LACERDA, I. A. C. **Obtenção e caracterização de kombucha de chá preto.** 69ª Reunião Anual da SBPC - Ciência e Tecnologia de Alimentos/Ciência de Alimentos. Junho, 2017.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, Foams and Suspensions: Fundamentals and Applications.** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.

SELVAM, S.; SARKAR, I. **Bile salt induced solubilization of methylene blue: study on methylene blue fluorescence and molecular mechanism based approach.** *Pharmaceutical Analysis*, v. 7, n. 1, 2016.

SENEDESE, J. M.; RODRIGUES, A. R.; FURTADO, M. A.; FAUSTINO, V. D.; BERRETTA, A. A.; MARCHETTI, J. M.; TAVARES, D. C. **Assessment of the**

Mutagenic Activity of Extracts of Brazilian Propolis in Topical Pharmaceutical Formulations on Mammalian Cells In Vitro and In Vivo. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2011, 2011.

SFORCIN, J. M. **Biological properties and therapeutic applications of propolis.** Phytotherapy Research, v. 30, p. 894-905, 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. **Propolis: is there a potential for the development of new drugs?** Journal of Ethnopharmacology, v. 133, p. 253-260, 2011.

SHEN, X.; DONG, L.; HE, X.; ZHAO, C.; ZHANG, W.; LI, X.; LU, Y. **Treatment of infected wounds with methylene blue photodynamic therapy: an effective and safe treatment method.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 32, 2020.

SILVA, E. R.; SANTOS, E. P.; RICCI-JÚNIOR, E. **Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações.** Revista Brasileira de Farmácia, v. 9, n. 3, p. 211-217, 2009.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; SILVA FILHO, A. A.; SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIIM, Y. M. **Effect of brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils.** Journal of Ethnopharmacology, v. 94, p.59-65, 2004.

SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. **Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria.** Anti-Infective Drug Discovery, v. 8, n. 2., 108-120, 2014.

SULAEVA I.; HENNIGES, U.; ROSENAU T.; POTTHAST A. **Bacterial cellulose as a material for wound treatment: properties and modifications. A review.** Biotechnology Advances, v. 33, p. 1547-1571, 2015.

TADA, D. B.; VONO, L. L. R.; DUARTE, E. L.; ITRI, R.; KIYOHARA, P. K.; BAPTISTA, M. S.; ROSSI, L. M. **Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: a potential magnetic carrier for photodynamic therapy.** American Chemical Society, 23, 8194-8199, 2007.

TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. **Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications.** Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 2, p. 175-191, 2005.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. **Biologia da ferida e cicatrização.** Fundamentos em Clínica Cirúrgica – Medicina; 41, 3, p. 259-64, Ribeirão Preto, 2008.

THOMAS, B.; MIDHUN, C. R.; ATHIRA K. L.; RUBIYAH, M. H.; JITHIN J.; MOORES, A.; DRISKO, G., L.; CLÉMENT SANCHEZ. **Nanocellulose, a versatile green platform: from biosources to materials and their applications**. Chemical Reviews, v. 118 (24), 11575-11625, 2018.

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**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Publishing Corporation, v. 2013, 2013.

TROVATTI, E.; SANTOS, A. M.; AMARAL, A. C.; MENEGUIN, A. B.; DRIUSSI, B.; PACHECO, G.; CARVALHO, R. A.; LAZARINI, S. C.; CARDOSO, V. M. O.; LUSTRI, R. W.; BARUD, H. S. **Biopolímeros: Aplicações Farmacêutica e Biomédica**. Eclética Química Journal, Araraquara, v. 41, n. 1, 2016.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖZANT, Ö.; DILSAH, C.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. **Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples**. Microbiological Research, 160, 189-195, 2005.

VICENTE, J. de. Rheology. Rijeka, Croácia: Intech Open, 2012.

VOLPI, M. **Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis**. Electrophoresis, v. 25, p. 1872-1878, 2004.

WANG, C.-C.; WANG, Y.-X.; YU, N.-Q.; HU, D.; WANG, X.-Y.; CHEN, X.-G.; LIAO, Y.-W.; YAO, J.; WANG, H.; HE, L.; WU, L. **Brazilian green propolis extract synergizes with protoporphyrin IX-mediated photodynamic therapy via enhancement of intracellular accumulation of protoporphyrin IX and attenuation of NF- κ B and COX-2**. Molecules, v. 22, n. 5, 2017.

WANG, P.H.; HUANG, B.S.; HORNG, H.C.; YEH, C.C.; CHEN, Y.J. **Wound Healing**. Journal of the Chinese Medical Association, 81, p.94-101, 2018.

WEN, X.; LI Y.; HAMBLIN, M. R. **Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: an update**. Phptpdagnosis and Photodynamic Therapy, v. 19, p. 140-152, 2017.

WOLCOTT, R. D.; RHOADS, D. D.; DOWD, S. E. **Biofilms and chronic wound inflammation**. Journal of Wound Care, v. 17, n. 8, 2008.

ZHANG, X.; XIA, L.Y.; CHEN, X.; CHEN, Z.; WU, F.G. **Hydrogel-based phototherapy for fighting cancer and bacterial infection**. Science China Materials, 60, 6, 487-503, 2017.

ZHAO, L.; PU, L.; WEI, J.; LI, J.; WU, J.; XIN, Z.; GAO, W.; GUO, C. **Brazilian green propolis improves antioxidant function in patients with type 2 diabetes**

mellitus. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 498, n. 13, 2016.

ZHEIGHAMPOUR, F.; ALIHOSSEINI, F.; MORSHED, M.; RAHIMI, A. A. **Comparison of prolonged antibacterial activity and release profile of propolis-incorporated PVA nanofibrous mat, microfibrous mat, and film.** Journal of Applied Polymer Science, 2018. DOI: 10.1002/APP.45794.

ZULKIFLI, F. H.; SILESHI, S.; HUSSAIN, F. S. J.; YUSOFF, M. **A facile synthesis method of hydroxyethylcellulose-silver nanoparticle scaffolds for skin tissue engineering applications.** Materials Science and Engineering C, 2017.