UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível
contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a
redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes
queimados”**

Andresa Aparecida Berretta

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**“Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível
contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a
redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes
queimados”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Andresa Aparecida Berretta

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado Marchetti

Ribeirão Preto

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Berretta, Andresa Aparecida

“Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados”, Ribeirão Preto, 2007.

152 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP - Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Marchetti, Juliana Maldonado

1. Própolis. 2. estudo pré-clínico. 3. estudo clínico. 4. pacientes queimados.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Andresa Aparecida Berretta

“Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Maldonado Marchetti

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais, ao meu marido e ao meu filho, os amores da minha vida.

E também aos pacientes queimados, que merecem um alívio para as dores físicas e emocionais.

Agradecimentos

Agradecimentos Especiais

Agradeço imensamente a oportunidade, concedida pelo Dr. Werther Guilherme Marchesan (cirurgião plástico Chefe da Unidade de Queimados da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-HCFMRP-USP), por poder conviver junto à sua equipe técnica multidisciplinar, participando do dia-a-dia da unidade, vivenciando o sofrimento dos pacientes queimados e seus familiares e principalmente, das dificuldades, limitações e avanços da cirurgia plástica reconstrutiva e do sistema público de saúde.

Tenho muito orgulho de ter sido orientada por um profissional com vasta experiência clínica, aberto a mudanças e extremamente preocupado em fazer o melhor por seus pacientes. As adversidades que presenciei em alguns momentos na unidade, somente me fizeram admirá-lo por sua coragem, pois pude perceber que se tratavam de problemas alheios aos conhecimentos médicos que acabavam afetando e/ou comprometendo o estado de muitos pacientes.

Ainda, agradeço especialmente a sua disponibilidade em conhecer nosso projeto e acreditar que a pesquisa clínica utilizando um medicamento contendo como substância ativa o Extrato Padronizado de Própolis, pode trazer avanços e crescimento à medicina e aos queimados. Obrigada pela sua preciosa orientação e condução dos nossos estudos clínicos.

Agradeço também de modo especial a Enfermeira Dra. Clarínia, pois foi a primeira pessoa da Unidade a me ouvir e a se interessar pela nossa proposta de trabalho, se chegamos ao Dr. Werther, sem dúvida, foi graças à atenção especial da Dra. Clarínia, que na ocasião e durante

todo o trabalho ficou bastante entusiasmada com a proposta e nos deu grande apoio e nos ensinou muito.

*Agradeço também a **Toda a Equipe da Unidade de Queimados**, não poderia citar um a um, para não incorrer na injustiça de me esquecer de alguém, mas posso dizer que todos vocês que passaram pela minha vida nessa fase tão importante, estão em meu coração. Aos que me deram apoio, os meus sinceros agradecimentos por tudo, pois, como farmacêutica, eu não dominava a rotina diária dos curativos e todas as técnicas de assepsia com os pacientes além da psicologia necessária para suportar tal rotina. Toda a ajuda recebida me foi muito útil. Obrigada pela paciência e grande atenção. Não foi fácil separar os fatos observados no hospital de minha vida particular, não eram raras as noites de insônia lembrando as crianças queimadas, as extensas cirurgias dos grandes queimados e também dos familiares aflitos, esperando por uma palavra amiga, além da correria da equipe tentando fazer o melhor para aliviar as dores e salvar vidas... O trabalho de todos me comoveu bastante, é preciso muito dom e coragem para fazer parte dessa atividade. Como é belo o trabalho das pessoas que se doam em prol dos doentes.*

Aos que não fizeram questão de ajudar, seja pela dificuldade em receber as mudanças ou por descrença em nosso projeto, também tenho a agradecer, pois saber lidar com as resistências e adversidades também nos faz aprender e crescer, obrigada por esse ensinamento. Só posso dizer que, sem mudança, não há avanço e tampouco crescimento. A evolução depende da coragem de tentar conhecer o novo. Os profissionais de saúde não podem parar no tempo por comodismo, é preciso tentar melhorar sempre!

Agradeço a todos os pacientes e seus familiares que concordaram em participar como voluntário nesse trabalho. Sem essa ajuda fundamental, nada teríamos atingido. Esperamos ter correspondido à altura o que vocês fizeram por nós!

À Dra. Juliana Maldonado Marchetti, pela amizade, carinho, paciência e orientação desse trabalho. Não tenho palavras para agradecer a confiança e oportunidade a mim confiada, pois sei que, em virtude da minha opção de trabalhar e desenvolver o meu trabalho de doutorado, não seria fácil encontrar um orientador que compreendesse, apoiasse e principalmente, confiasse na minha dedicação e capacidade para alcançar os objetivos almejados. Imagino a sua responsabilidade em aceitar um aluno para orientar um trabalho de doutorado e conheço as cobranças da universidade, assim, só tenho a agradecer a sua confiança. Se hoje alcanço essa vitória, é graças ao seu carinho e amizade! Obrigada por tudo!

Ao Sr. Manoel Eduardo Tavares Ferreira, Marley de Barros Ferreira e Antônio Carlos Meda, por todo apoio a esse projeto, tanto apoio emocional, profissional, intelectual e também financeiro. É graças à oportunidade que a Apis Flora me cedeu que consegui atingir um grande sonho, desenvolver um trabalho com novos produtos focado em uma atividade tão nobre que é tentar amenizar o sofrimento, pelo menos físico, dos pacientes queimados, além, de conseguir continuar a pós-graduação com o curso de doutorado. Sem dúvida, a compreensão e apoio foram fundamentais para o início e conclusão desse trabalho.

Agradecimentos

A Deus, por ter me concedido a vida e ter me abençoado com muita saúde, força de vontade e persistência. Agradeço por todos os momentos da minha vida e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, ***José Roberto e Eva Lúcia***, que me ofereceram a vida, educação e principalmente, abriram mão dos seus sonhos em favor dos meus. Se hoje alcanço essa conquista, sem dúvida é graças ao amor, carinho, apoio incondicional dos meus amados pais e da minha irmã ***Andréia***, que eu não tenho como agradecer se não através do meu amor.

Ao meu marido ***Alfredo***, por seu amor, carinho e atenção, por sempre ter acreditado no meu trabalho e capacidade profissional, e estar constantemente me incentivando a ir mais além. Muito obrigada querido, sua paciência e apoio sempre me ajudaram a superar as dificuldades e acreditar que nós podemos alcançar todos os nossos sonhos. Amo muito você e desejo poder retribuir tudo o que você faz por mim, aliás, por nós três!

À minha família do coração, ***Sr. Antônio e Maria Inácia Mantelo, Marcos César e Renata, Lorenzo, André e Letícia***, vocês são muito importantes na minha vida, o imenso amor e carinho que nós sentimos sempre me auxiliaram em todos os momentos. A vocês que acompanharam, apoiaram e incentivaram esse projeto, os meus sinceros agradecimentos! Vocês acompanharam de perto as dificuldades encontradas com cada paciente, os meus medos, angústias, tristezas, a ansiedade e o sofrimento que eu sentia a cada paciente que chegava à Unidade de Queimados. Seguindo os seus conselhos, Maria Inácia e S. Toninho, acredito que consegui transmitir consolo, confiança e a fé a muitos pacientes! Obrigada por tudo, desejo poder ser para vocês o que vocês são para mim.

A ***toda minha família e amigos*** que sempre compreenderam minha ausência física e confiaram no meu potencial.

À ***Maria Helena, Mônica, Gabi e Gi, e aos novos amigos que conquistei***, por fazerem parte da minha vida e da minha família, pelo carinho, amizade e por todos os momentos que vivemos e que iremos viver juntos, nossa caminhada está apenas começando!

À **grande amiga Aline e ao Evandro**, que fazem parte, de modo muito especial, da minha vida, vocês são os amigos de todas as horas, nas alegrias e nas dificuldades. Obrigada por tudo! Aproveito esse agradecimento para também homenagear a todos os amigos, pois os amigos deixam a vida mais leve, “*amigo*”, como já dizia a música, “*é coisa pra se guardar, do lado esquerdo do peito*”. Os amigos são verdadeiras Bênçãos de Deus!

Ao **Alexandre Henrique Oliveira**, que muito se dedicou e contribuiu com esse trabalho, sem a sua preciosa ajuda e amizade, seria muito mais difícil!

À **D. Celina, Danilo e Agostinho**, que constantemente me auxiliam todos os dias sob vários aspectos, obrigada pelo imenso carinho. Vocês são pessoas especiais!

À farmacêutica e grande amiga, **Paula Carolina Pires Bueno**, pela participação nos protocolos analíticos, discussão de metodologia, enfim, além do apoio técnico, pelo imenso carinho e participação na minha vida.

À farmacêutica e grande amiga, **Edna Barizon**, pela participação na elaboração dos protocolos microbiológicos desse trabalho, experiência profissional, e principalmente, pelo carinho e confiança no meu trabalho.

Ao **Henrique Moretto, Shirley e Raul**, pela imensa ajuda na elaboração das artes, pelas opiniões e grande amizade! Obrigada pela imensa ajuda.

A **todos os amigos da Apis Flora**, que sempre contribuíram de forma muito intensa e carinhosa para a realização deste trabalho, ***não poderia listar todos para não cometer a injustiça de me esquecer de alguém.*** A vocês, que sempre me ajudaram nos problemas do dia-a-dia, pela convivência, pelo carinho e amizade sincera, os meus sinceros agradecimentos. A nossa convivência e amizade nos faz uma grande família.

À Profa. **Dra. Denise Crispim Tavares** e à aluna **Juliana Marques Senedese**, pelo excelente trabalho realizado e grande contribuição ao presente trabalho.

À Profa. Dra. **Lusiane M. Bendhack** pela orientação na Iniciação Científica, pela intensa contribuição na minha formação acadêmica e na minha vida. Obrigada pela amizade e confiança na minha capacidade.

À Prof. Dra. **Elza Helena Guimarães Lara** por ter me concedido a oportunidade de começar minha vida científica em seu laboratório e ter trabalhado com funcionários tão especiais, como o Mário, José Orestes e Roger.

Ao Prof. Dr. **Jairo Kenupp Bastos**, ao **Luiz Elídio Gregório**, **João Paulo** e ao **Waltinho**, pela grande contribuição e ajuda.

Aos **funcionários da Seção de Pós-graduação** que sempre estiveram foram muito atenciosos, pacientes e gentis comigo.

À **FCFRP/USP** pela oportunidade de estudo, crescimento, aprendizado, infra-estrutura física e profissionais altamente qualificados, capazes de promover a ciência e possibilitar o desenvolvimento deste trabalho, que tem por objetivo maior o desenvolvimento de um produto que possa ser viabilizado industrialmente e possa vir a ser uma alternativa terapêutica voltada para o bem do paciente, especialmente o paciente queimado, que apresenta um grande sofrimento.

Obrigada a todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste projeto, certamente a vida sem os colegas e amigos não seria nada fácil. Aprendi que todos podemos e devemos nos ajudar. Ninguém vive sozinho. Só tenho a agradecer, em todos os sentidos.

“Um trecho da canção “Volta por cima”, de Paulo Vanzolini. diz: “Reconhece a queda, mas não desanima, levanta, sacode a poeira e dá volta por cima”. A música fala do senso de coerência, isto é, a habilidade de nos mantermos mentalmente saudáveis, a despeito da sensação de desamparo de uma vivência traumática. De dar sentido emocional à vida e perceber que a crise pode ser vista mais como desafio do que problema. Que uma visão mais compreensiva do mundo nos afasta do sofrimento e que somos capazes de suportar as adversidades. É através da reflexão que superamos o luto, transformamos a dor em estímulo e melhoramos nossas vidas. Podemos usar os recursos da fé ou os filosóficos para reorientar as emoções. Não devemos deixar que o sofrimento assuma proporções ainda maiores. Não podemos sofrer interminavelmente por algo que já aconteceu. O tempo é o maior aliado e ajuda no processo de recuperação. Voltar a sentir felicidade é um compromisso que devemos assumir sozinhos”

Kátia Maranhão

...

E assim deve ser...

Uma página virada, porém jamais esquecida...

...Um novo começo, uma nova etapa, uma nova vida...

E que a nova etapa, cheia de amor, seja bela e feliz!

Que a nova vida que está chegando encontre um lar cheio de amor e paz!

E que nosso ninho, seja abençoado...

Alfredo,

“Nossos olhos tiveram a mesma culpa, os seus porque me olharam, os meus porque te quiseram”.

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Símbolos	vii
1. Introdução.....	01
2. Revisão de Literatura.....	05
2.1 Própolis.....	06
2.2. Polímero não-iônico	17
2.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana “in vitro”	22
2.4 Avaliação da Atividade Cicatrizante “in vivo”	25
2.5 Avaliação do potencial genotóxico “in vivo”	29
2.6 Avaliação do Tempo de Cicatrização – Pesquisa Clínica	32
3. Objetivos.....	35
4. Material e Métodos	37
4.1. Etapa pré-clínica.....	38
4.1.1 Material.....	38
4.1.1.1 Materiais	38
4.1.1.2 Equipamentos	39
4.1.1.3 Animais.....	39
4.1.2. Métodos.....	40
4.1.2.1. Obtenção do gel termorreversível contendo EPP-AF.....	40
4.1.2.2. Caracterização Química do Extrato de Própolis.....	41
4.1.2.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana “in vitro”	43
4.1.2.4 Avaliação da Atividade Cicatrizante “in vivo”	49
4.1.2.5 Avaliação do potencial Genotóxico “in vivo”	53

4.2 Etapa Clínica	55
4.2.1 Casuística.....	55
4.2.2 Material.....	56
4.2.3 Equipamentos	56
4.2.4 Método	56
5. Resultados e Discussão	59
5.1 Caracterização química da própolis.....	63
5.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana “in vitro”	68
5.3 Avaliação da Atividade Cicatrizante “in vivo”	81
5.4 Avaliação do potencial genotóxico “in vivo”	93
5.5 Avaliação do Tempo de Cicatrização – Pesquisa Clínica	102
6. Conclusões.....	122
Referências.....	124
Anexos	136

RESUMO

BERRETTA, A.A. Pesquisa pré-clínica e clínica de um gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) para a redução do tempo de cicatrização de lesões em pacientes queimados. 2007. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

O estudo realizado compreendeu a avaliação pré-clínica e clínica de uma forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis – EPP-AF para o tratamento de queimaduras. Utilizamos um polímero com características termorreversíveis que possibilitaram a obtenção de um produto que se mantém na forma líquida quando a baixas temperaturas e geleifica *in situ*. A forma farmacêutica proposta visa maior comodidade e adesão do paciente, obtenção de um tecido epitelial organizado e menor tempo para a cicatrização da área. Neste trabalho, foi avaliada a atividade antimicrobiana “in vitro”, do extrato de própolis e dos géis obtidos, através da técnica de difusão em agar e também através do método de microdiluição em microplacas contendo caldo de enriquecimento e o revelador trifeniltetrazólio, frente aos microrganismos *S. aureus*, *M. luteus* e *P. aeruginosa*. O potencial mutagênico foi estudado em modelo experimental utilizando micronúcleos de sangue periférico de ratos wistar. A histologia do tecido formado em lesão induzida com a utilização de um “punch” para biópsia e a eficácia do produto em pacientes queimados também foram objeto deste estudo. As áreas doadoras foram utilizadas como modelos experimentais. Os resultados demonstraram que o extrato de própolis apresentou atividade frente aos microrganismos pesquisados sendo que os géis não se difundiram em disco. Em microdiluição, o modelo utilizado para estudo da atividade antimicrobiana não foi adequado ao microrganismo *M. luteus*, mas foi possível a obtenção do CIM para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, que foram respectivamente, 50 ug/mL e 200 ug/mL. O produto não apresentou potencial genotóxico nos tratamentos agudo, sub-agudo e crônico. A pesquisa clínica demonstrou que o gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis 3,6%p/v apresentou tempo de cicatrização semelhante à pomada contendo nitrofurazona (furacin[®]), tratamento referência utilizado na Unidade de Queimados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Palavras-chave: própolis, gel termorreversível, pré-clínico, clínico, queimados.

ABSTRACT

BERRETTA, A.A. Pre-clinical and clinical research of a thermoreversible gel formulation containing standardized propolis extract (EPP-AF) to reduce healing time of lesions in burn victims. 2007. Thesis Doctoral. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

The present paper examines the pre-clinical and clinical evaluation of a pharmaceutical form that provides sustained delivery of a formulation containing standardized propolis extract – EPP – AF to the treatment of burn wounds. There has been used a polymer with thermoreversible characteristics which made possible the obtaintion of a product that maintains its liquid state in low temperatures and provides *in situ* gelling property. The proposed pharmaceutical form intends to enhance patient's comfort and acceptance, to obtain a histological well-organized skin tissue and to reduce wound healing time. This study evaluated *in vitro* the antimicrobial activity of propolis extract and obtained gels using the agar-diffusion method and also a broth microdilution method with microdilution in microplates containing serially diluted antimicrobial and triphenilthetrazolium agent, against microorganisms *S. aureus*, *M. luteus* e *P. aeruginosa*, the mutagenic potential using micronuclei of peripheral blood Wistar rats experimental models, the histology of neo-formed tissue induced by lesions done with a punch and the effectiveness of the products in burn patients, using skin-grafting donor sites like experimental models. The results show that propolis extract has activity against the listed microorganisms and that the gels did not spread into agar medium plate. In the microdilution method, the used model for the antimicrobial activity study is not adequate to the microorganism *M. luteus*, but it was possible for the obtention of CIM to *S. aureus* e *P. aeruginosa*, which were, respectively, 50 ug/mL e 200 ug/mL. The product did not show genotoxic potential to acute, subacute and chronic treatments. The clinical research show that the thermoreversible gel formulation containing standardized propolis extract 3,6%p/v presented wound healing time similar to the reference treatment used in the Burn Victims Unity witch is nitrofurazone cream (furacin®).

Key-words: propolis, thermoreversible gel, pre-clinical study, clinical study, burn patients

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Fotografia apresentando o animal com a lesão de 0,5 cm de diâmetro / 2 mm de profundidade, provocada pela utilização de um “punch” para biópsia.	50
Figura 02 - Fotografia de pele normal antes da produção da lesão.	52
Figura 03 - Ilustração de pele normal e lesada esquematizando o local morfometrado.	52
Figura 04 - Perfil cromatográfico do extrato de própolis através de CLAE.	66
Figura 05 - Placa de Petri contendo na superfície do ágar cultura de microrganismos e as amostras sob análise.	73
Figura 06 – Fotografia da microplaca apresentando a atividade antimicrobiana através de microdiluição, utilizando o microrganismo gram positivo <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923, <i>M. luteus</i> e o revelador químico cloreto de trifêniltetrazólio.	76
Figura 07 – Fotografia da microplaca apresentando a atividade antimicrobiana através de microdiluição, utilizando <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 e o revelador cloreto de trifêniltetrazólio , incluindo-se o estudo de inativação do sistema conservante.	78
Figura 08 – Fotografia apresentando o processo cicatricial do grupo controle (figura 9 A) e do grupo empregando gel sem própolis (B e C) com 3 dias de tratamento.	83
Figura 09 - Fotografia apresentando o tratamento com gel a 1,2% de extrato seco de própolis. Processo cicatricial com 3 dias de tratamento.	84
Figura 10 - Fotografia apresentando processo cicatricial com 3 dias de tratamento, com gel a 2,4 e 3,6% de extrato seco de própolis.	87
Figura 11 - Representação gráfica do tecido de preenchimento da lesão após 3 dias de tratamento com as amostras testadas, no protocolo de aplicação única e 2 aplicações ao dia (conforme apresentado na Figura 03) – Profundidade da lesão 2 µm).	92
Figura 12 - Frequências de PCEMNs obtidas nos tratamentos agudo, subagudo e crônico.	97
Figura 13 – Eritrócito policromático micronucleado (A), sem micronúcleo (B) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (C).	99
Figura 14 – Distribuição média dos pacientes por grupos (áreas) e tempo médio para cicatrização das áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF), aplicados na quantidade de 10 mL de produto / rayon utilizado.	114
Figura 15 - Distribuição média dos pacientes por grupos (áreas) e tempo médio para cicatrização das áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF), aplicados na quantidade de 20 mL de produto / rayon utilizado.	114
Figura 16 - Distribuição média dos pacientes por grupos (áreas) e tempo médio para cicatrização das áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF).	115

Figura 17 - Fotografia de área doadora do grupo I (couro cabeludo), com espessura do enxerto de 6,0 milésimos de polegada e 20,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.....	116
Figura 18 - Fotografia de área doadora do grupo III (membros inferiores), com espessura do enxerto de 8,0 milésimos de polegada e 20,0 mL do produto em uma tira de rayon, área não ocluída nas primeiras 24 horas.....	117
Figura 19 - Fotografia de área doadora do grupo I (couro cabeludo), com espessura do enxerto de 6,0 milésimos de polegada e 10,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.....	118
FIGURA 20 – Fotografia de área doadora do grupo III (membros inferiores), com espessura do enxerto com 8,0 milésimos de polegada e 10,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.	119
FIGURA 21 – Fotografia de área doadora do grupo III (membros inferiores), com espessura do enxerto com 8,0 milésimos de polegada e 10,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Caracterização do Extrato Padronizado de Própolis (EEP e EGP), utilizados no presente estudo (n=3). Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão.	66
Tabela 02 - Apresentação dos resultados de atividade antimicrobiana através de técnica de difusão em ágar (mm) dos extratos avaliados e da concentração de própolis utilizada nos géis.	69
Tabela 03 – Leitura das microplacas, para os microrganismos <i>M. luteus</i> e <i>S. aureus</i> . Os sinais (+), indicam que houve crescimento de microrganismo, enquanto os sinais (-) indicam que não houve crescimento microbiano.	74
Tabela 04 – Leitura das microplacas. Os sinais (+), indicam que houve crescimento de microrganismo, enquanto os sinais (-) indicam que não houve crescimento microbiano.	77
Tabela 05 – Leitura das microplacas, para a <i>Pseudomonas</i> . Os sinais (+), indicam que houve crescimento de microrganismo, enquanto os sinais (-) indicam que não houve crescimento microbiano.	79
Tabela 06 - Somatória das freqüências de PCEMNs obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento agudo com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles. Cada grupo de tratamento possui 5 animais e foram analisadas 2000 PCEs/animal.	94
Tabela 07 - Somatória das freqüências de PCEMNs obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento subagudo com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles. Cada grupo de tratamento possui 5 animais e foram analisadas 2000 PCEs/animal.	95
Tabela 08 - Somatória das freqüências de PCEMNs obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento crônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles. Cada grupo de tratamento possui 5 animais e foram analisadas 2000 PCEs/animal.	96
Tabela 09 - Valores das médias e desvios-padrão das freqüências de PCEMNs observados nos tratamentos agudo, subagudo e subcrônico para o gel contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura.	96
Tabela 10 - Porcentagem de PCEMNs e IDN (índice de divisão nuclear) obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento agudo, subagudo e crônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles.	97
Tabela 11 – Distribuição dos pacientes por região de área doadora (grupos), espessura de pele retirada e quantidade de produto administrado.	105
Tabela 12 - Informações sobre a população utilizada no estudo dos medicamentos, furacin e gel termorreversível contendo 3,6% de extrato padronizado de própolis (EPP-AF).	106

Tabela 13 – Relação dos pacientes, grupos, espessura de pele retirada, e tempo (em dias) para cicatrização nas áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF), com a aplicação de 20 ml de produto. 107

Tabela 14 – Relação dos pacientes, grupos, espessura de pele retirada, e tempo (em dias) para cicatrização nas áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato de própolis (EPP-AF), com a aplicação de 10 ml de produto. 109

TABELA 15 – Distribuição média dos pacientes por grupos (áreas), espessura média de pele retirada, quantidade de produto administrado e tempo médio para cicatrização nas áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF). 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
MN	Micronúcleo
PCE	Eritrócitos policromáticos anucleados
NCE	Eritrócitos normocromáticos
PCEMNs	Eritrócitos policromáticos micronucleados
pH	Potencial Hidrogeniônico
HC-FMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina Ribeirão Preto
FORP-USP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
EPP-AF	Extrato padronizado de Própolis - Apis Flora
FMRP	Faculdade de Medicina Ribeirão Preto
GEP	Gel contendo EPP-AF a 3,6% p/v de extrato seco de própolis
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>M. luteus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
HE	Hematoxilina-eosina
p.c.	Peso corpóreo
hs	Horas
SD	Desvio-padrão
μL	Microlitros
nm	Nanômetro
mg	Miligramas
g	Gramas
mL	mililitros
SSK	Solução de sorbato de potássio
μm	micrômetros
CPA	Ciclofosfamida
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
EGP	Extrato Glicólico de Própolis
NO	Óxido nítrico
COX	Ciclooxigenase
®	Marca Registrada
UR	Umidade Relativa
PA	Para análise

p/p	Peso/pesp
p/v	Peso/volume
v/v	Volume/volume
LDH	Lactodesidrogenase láctica
CAPE	Ácido caféico fenetil éster
° C	Graus Celsius
OPP	Óxido de polipropileno
OPE	Óxido de polietileno
CLOR	Cloranfenicol
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6

1. Introdução

As lesões por queimaduras são a terceira causa de morte acidental em todas as faixas etárias, sendo que 75% dessas lesões resultam da ação da vítima e ocorrem no ambiente domiciliar. Nos Estados Unidos, 70.000 pessoas são hospitalizadas a cada ano, com ferimentos graves causados por trauma térmico (MARTINS et al., 2002). As queimaduras podem ser provocadas por agentes físicos (temperatura, radiação e eletricidade) ou químicos (ácidos e álcalis), e seu grau de gravidade depende diretamente da intensidade ou concentração do agente causal bem como do tempo de exposição aos mesmos (FERNANDES et al., 1995). Grande parte dos pacientes queimados permanece internada por um período variável, que depende da extensão e da profundidade da lesão. Assim, quanto mais rápida for a cicatrização da área, melhor para os pacientes e para o sistema público, já que esses pacientes permanecem internados por, no mínimo, 15 dias, gerando gastos para o sistema hospitalar e um grande desconforto para os pacientes e seus familiares.

O tratamento envolve a administração de substâncias com atividade antibacteriana e que estimulam o processo de cicatrização. Considerando que a própolis (um produto elaborado pelas abelhas a partir dos exsudatos vegetais) é constituída por diversas substâncias, envolvendo ácidos, ésteres, óleos, sendo que de todas, os flavonóides e os compostos fenólicos são os principais, e dentre as suas atividades biológicas destaca-se a antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, antioxidante, antitumoral, dentre outras, acreditamos ser viável o desenvolvimento de um medicamento contendo a própolis como substância ativa. Os mecanismos responsáveis pelas melhorias nas condições de saúde

observadas com o uso da própolis na medicina popular ainda não estão elucidados, mas estudos científicos têm sido realizados nesse sentido.

Em trabalho anterior (BERRETTA, 2003) desenvolveram um produto de uso tópico a base de própolis. O sistema foi obtido a partir de um copolímero poloxamer 407, inerte e atóxico e capaz de originar soluções coloidais tipo gel, termorreversíveis na presença de água e capaz de afetar o comportamento da solução e a difusão das moléculas da substância ativa (PAAVOLA et al., 1995; SCHMOLKA et al., 1972). A baixa toxicidade e irritação cutânea causadas pelo poloxamer 407 levaram a avaliação do potencial de aplicação dermatológica destes géis, particularmente no tratamento de queimaduras, considerando as vantagens com relação à facilidade de aplicação e de remoção da preparação e também com relação a manutenção da concentração terapêutica no local da aplicação (NALBANDIAN et al., 1987).

As características desejadas para um produto de uso tópico para áreas queimadas envolvem a capacidade de regeneração tissular, a atividade antimicrobiana, já que a presença de microrganismos na área afetada compromete o processo cicatricial, a ausência de toxicidade, a facilidade de aplicação e de remoção do produto.

As características termodinâmicas do gel, isto é, a forma líquida quando a baixas temperaturas e a geleificação *in situ*, favorecem o uso de embalagens que não permitem a contaminação do produto na área lesada, adequadas a esse grupo de pacientes, como uma embalagem tipo spray, por exemplo, já que,

inclusive, o toque nas áreas lesadas é extremamente doloroso. A sensação fria do gel no ato da aplicação auxilia no alívio da dor local e favorece a adesão ao tratamento. Tais características, associadas aos estudos prévios do poloxamer 407 e da própolis, nos motivaram a avaliar “in vitro” e “in vivo” as características do gel previamente desenvolvido.

Para a avaliação pré-clínica foram utilizados métodos “in vitro” e “in vivo”, com objetivo de avaliar a segurança e a eficácia do produto. Os estudos são necessários para a posterior avaliação das características de cicatrização nos estudos clínicos com os pacientes queimados.

A avaliação da segurança foi realizada através da avaliação do potencial genotóxico (estudo da indução de danos ao DNA). O estudo de eficácia foi realizado através da avaliação da atividade antimicrobiana “in vitro” e da atividade cicatrizante “in vivo” também pela pesquisa clínica.

2. Revisão de Literatura

2.1 Própolis

Nas últimas décadas foi possível observar um interesse cada vez maior pelas plantas medicinais e terapias naturais. Os produtos obtidos de abelhas da espécie *Apis mellifera* como o mel, a geléia real, o pólen e a própolis, têm apresentado grande aceitação, principalmente pelas suas propriedades terapêuticas. Dentre os diversos produtos apícolas, a própolis vem se destacando pela grande perspectiva de utilização nas indústrias farmacêutica, cosmética e de alimentos.

A própolis é elaborada pelas abelhas a partir de resinas vegetais e exsudatos. As abelhas transportam esta matéria-prima para dentro da colméia e adicionam secreções próprias, com enzimas existentes em sua saliva (KOO et al., 1996; BURDOCK et al., 1998; CASTALDO et al., 2002; RUSSO et al., 2002). A própolis é uma substância resinosa, que possui coloração e consistência intimamente relacionada à flora visitada pelas abelhas (KOO et al., 1996) e a estação na qual é coletada (SANTOS et al., 2003).

A variação da composição química da própolis está relacionada com sua origem botânica, sendo também a proporção das substâncias dependente dessa variação. Foram encontrados em sua composição vários compostos: ácido benzóico e alguns dos seus derivados (ácido hidróxi- 4 - benzóico, metóxi - 4 - benzóico, procatéquico e gálico) ácido cinâmico e alguns dos seus derivados (ácido *p*-cumárico, também sob forma de cumarato de benzila). Também foram identificados muitos ésteres de ácidos: de benzila e de cinamila do ácido cafeico,

de benzila, de cinamila. Além destes, foram encontrados vanilina, isovanilina, acetóxi-betulenol, dentre outros (MARCUCCI et al., 1996).

Entretanto, Sforcin et al. (2000) e Sforcin et al. (2002) já demonstraram que a atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, bem como a atividade imunomoduladora, não variou em função da época da colheita da mesma. De qualquer forma, as concentrações dos princípios ativos merecem atenção e controle e, desta forma, um extrato padronizado de própolis foi desenvolvido e avaliado por Berretta (2003), cujos estudos resultaram no depósito de um pedido de patente junto ao INPI (PI0405483-0).

As atividades farmacológicas da própolis são conhecidas desde a antiguidade. No Egito, ela era empregada para embalsamar os mortos (CASTALDO et al., 2002) e Aristóteles considerava a própolis como um medicamento para o tratamento de doenças da pele, de feridas e de supurações (PAMPLONA et al., 1997). Recentemente outras propriedades biológicas têm sido reportadas, incluindo, a citotoxicidade, atividade antitumoral e anti-HIV (PARK et al., 2004).

Sforcin et al. (2002), avaliaram alguns parâmetros bioquímicos de animais tratados com amostras de própolis obtidas de diversas regiões com o objetivo de avaliar a segurança de uso do produto e também se as variações regionais poderiam interferir nos resultados. Os autores determinaram as concentrações de proteínas totais, glicose, uréia, creatinina, triglicerídios, colesterol, HDL-colesterol e das aminotransferases e da desidrogenase láctica (LDH). No estudo não foram

evidenciados parâmetros considerados fora dos padrões normais e a variação regional não interferiu nos parâmetros estudados.

Vargas et al. (2004), demonstraram que o extrato alcoólico de própolis a 50% apresentou atividade antimicrobiana “in vitro”, inibindo o crescimento de 67,7% das amostras de *Nocardia asteróides*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas. Os autores demonstraram também que as bactérias gram positivas foram mais sensíveis (92,6%) ao extrato testado do que as gram negativas (42,5%). Das bactérias avaliadas, a *Nocardia asteróides* foi a mais sensível (100%) e a *Pseudomonas aeruginosa*, a gram negativa que apresentou maior sensibilidade (72,4%) ao extrato de própolis.

Sonmez et al. (2005), estudaram a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade em fibroblastos gengivais de seis amostras de própolis. Das amostras avaliadas, duas foram preparadas partindo-se de um extrato seco obtido da Sigma e duas a partir da própolis proveniente da Turquia. Para as duas origens, preparou-se um extrato a 10% de própolis, sendo um em solução hidroalcoólica a 70% e a outra em propilenoglicol. Foram estudadas ainda duas amostras obtidas no mercado, provenientes dos EUA (20% de própolis) e da Austrália (30% de própolis). As duas amostras continham no rótulo a informação de não conter álcool em sua composição. Os resultados demonstraram que os extratos obtidos dos EUA e da Austrália obtiveram os melhores resultados com relação à atividade antimicrobiana, sendo efetivos nas concentrações de 0,586 mg/mL e 2,34 mg/mL, respectivamente. Entretanto, nestas mesmas

concentrações, as amostras apresentaram citotoxicidade aos fibroblastos gengivais. Já as amostras provenientes da Sigma e da Turquia, não apresentaram a mesma atividade antimicrobiana que os produtos obtidos do mercado na concentração de 0,390 mg/mL, porém, foram consideradas mais seguras em relação aos fibroblastos gengivais. Assim, os autores concluíram que a dose considerada segura para a integridade dos fibroblastos gengivais, neste estudo, foi aquela correspondente a 0,390 mg/mL.

Sforcin et al. (2000) também avaliaram a atividade antimicrobiana de amostras de própolis obtidas de várias regiões. Os estudos foram conduzidos em uma escala de concentração entre 0,4 a 14,0% (v/v). Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas na atividade antimicrobiana das diferentes amostras frente aos microrganismos testados, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo que a concentração inibitória mínima para *S. aureus* foi 0,4% e para *E. coli* variou de 4,5 a 8,0%.

Gebara et al. (2002), estudaram a atividade antimicrobiana do extrato de própolis frente a diversos microrganismos responsáveis pelas doenças periodontais, e evidenciaram que todos os patógenos avaliados apresentaram sensibilidade ao extrato testado, motivando os pesquisadores a continuarem os estudos e formularem produtos com finalidade profilática e curativa para os problemas periodontais.

Oksuz et al. (2005), estudaram o efeito antimicrobiano e antiinflamatório do extrato de própolis e de ciprofloxacina em queratite experimental causada por

Staphylococcus aureus em coelhos. Os resultados demonstraram que a associação de extrato de própolis e ciprofloxacina apresentaram resultados melhores do que a aplicação de cada produto isoladamente. O valor da concentração inibitória mínima determinada no estudo foi de 1.024 µg/mL de própolis.

Ozturk et al. (1999), demonstraram o efeito cicatrizante do extrato aquoso de própolis a 1% em córnea lesada de ratos, comparado com a aplicação tópica de acetilcolina e com o grupo controle, que recebeu salina em tampão fosfato. O tratamento foi realizado durante três dias, sendo a aplicação para os três grupos de seis vezes ao dia, com início do tratamento logo após o debridamento. Os resultados demonstraram que tanto a acetilcolina quanto o extrato aquoso de própolis foram capazes de promover a cicatrização da área lesada.

Gregory et al. (2002), avaliaram e compararam a utilização de um creme a base de própolis com um creme contendo sulfadiazina de prata no tratamento de pacientes apresentando queimaduras de 1º a 2º graus. Os resultados demonstraram que a utilização de produto contendo própolis nos pacientes queimados foi viável, já que o produto reduziu o tempo de cicatrização, o custo do procedimento, o desconforto do paciente e o risco de alergias, considerando que a sulfadiazina apresenta um potencial alergênico acentuado.

Vynograd et al. (2000), mostraram que uma pomada contendo 3% de extrato de própolis, padronizada em flavonóides, demonstrou ser mais efetiva do

que as pomadas contendo aciclovir e placebo na cicatrização de lesões de herpes genital e na redução de sintomas locais.

Díaz et al. (1997), avaliaram a eficácia de uma tintura de própolis a 5% em feridas sépticas faciais de um grupo de pacientes. Os resultados mostraram que cerca de 90% dos pacientes se recuperaram com sete dias de tratamento e o restante levou treze dias para a completa cicatrização das feridas.

Azevedo et al. (1986), avaliaram a utilização de uma pomada de própolis a 3% em pacientes apresentando escaras de decúbito. Os resultados apresentados demonstraram vantagens significativas na evolução da cicatrização das escaras em relação ao tratamento convencional utilizado no hospital. Houve maior rapidez na regeneração da área lesada e maior adesão dos pacientes ao tratamento. Os outros ressaltam o baixo custo do produto em relação àqueles habitualmente utilizados.

Magro-Filho e Carvalho (1990), avaliaram a utilização de uma solução hidroalcoólica de própolis a 10% na cicatrização de áreas de extração dentária e demonstraram que a própolis acelerou o reparo tissular da área tratada.

Kujumgiev et al. (1999), demonstraram que os extratos de própolis obtidos de diversas regiões apresentaram atividade antimicrobiana (*S. aureus* e *E. coli*), antifúngica (*Candida albicans*) e antiviral (*Avian influenza* vírus), sendo que a origem da própolis não afetou as atividades propostas no estudo. A própolis obtida de zonas temperadas apresenta em sua constituição flavonóides e ésteres do ácido fenólico, que segundo alguns autores, são responsáveis pelas atividades

mencionadas, porém, as amostras provenientes de regiões tropicais não contêm tais substâncias e, no entanto, apresentaram também as atividades estudadas, mostrando que outras substâncias podem também estar relacionadas a tais atividades.

Banskota et al. (2000), estudaram as atividades citotóxica, hepatoprotetora e seqüestrante de radicais livres de amostras de própolis provenientes do Brasil, Peru, Suécia e China. Os resultados mostraram forte atividade antioxidante para os extratos aquosos obtidos do Brasil e da China em relação aos correspondentes extratos metanólicos, enquanto no caso dos extratos obtidos do Peru e Suécia, os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou como solvente extrator o metanol. Todos os extratos metanólicos avaliados demonstraram poderosa atividade citotóxica em modelos empregando células de carcinoma de cólon e fibrosarcoma. A atividade hepatoprotetora foi evidenciada para as própolis originárias do Brasil.

Atualmente mais de 300 compostos, principalmente polifenóis, têm sido identificados como constituintes da própolis (PAAVOLA et al., 1995). A maioria dos polifenóis são flavonóides, seguidos pelos ácidos fenólicos e ésteres, aldeídos, cetonas etc (CASTALDO et al., 2002). As propriedades farmacológicas da própolis são principalmente atribuídas à presença dos flavonóides. A opinião prevalecente é que a marcante atividade biológica dos flavonóides é, em parte, devido a sua capacidade de proteção contra a ação agressiva dos radicais livres (RUSSO et al., 2002). A atividade antimicrobiana tem sido atribuída aos flavonóides e ácidos e aos ésteres aromáticos presentes na resina, mas a relação

entre estrutura e atividade antimicrobiana da própolis ainda está sendo elucidada (MARCUCCI et al., 2001).

Os flavonóides são pigmentos das plantas sintetizados a partir da fenilalanina. Apresentam-se, geralmente sob uma variedade de cores encontradas nas pétalas das flores, sendo que a grande maioria emite uma fluorescência brilhante quando excitados pela luz ultra-violeta (UV) e são onipresentes nas células das plantas verdes. Os flavonóides são utilizados pelos botânicos para classificação taxonômica. Eles regulam o crescimento das plantas pela inibição da exocitose de auxina, assim como pela indução de expressão gênica e também influenciam outras células de várias formas. Os flavonóides inibem ou matam muitas cepas bacterianas, inibem importantes enzimas virais, como a transcriptase reversa e a protease e destroem alguns protozoários patogênicos. Ainda assim, a sua toxicidade às células animais é baixa. A ingestão diária de flavonóides com a alimentação normal, especialmente frutas e legumes, corresponde a cerca de 1,0 – 2,0 g. Os médicos têm aumentado as indicações de flavonóides purificados para tratar muitas doenças comuns, devido a sua habilidade para inibir enzimas específicas, simular alguns hormônios e neurotransmissores e captar radicais livres (HAVSTEEN, 2002). Dentre suas atividades biológicas destacamos: a antialérgica, a antiinflamatória, a antioxidante e sequestrante de radicais livres, dentre outras. Existem várias classes de flavonóides, as flavanas, flavonóis, flavonas, flavanonas, etc.

Os flavonóides recentemente têm sido incluídos em estudos toxicológicos para avaliação dos parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos. A baixa

toxicidade dos flavonóides se dá em função da baixa solubilidade das agliconas em água e do rápido catabolismo do núcleo pirona no fígado. Os flavonóides obtidos dos alimentos são absorvidos pelo trato gastrointestinal, enquanto os medicamentos originários dos mesmos são administrados diretamente nos tecidos-alvo, se estes forem acessíveis, como por exemplo, na pele, garganta, via nasal ou sistema vascular (HAVSTEEN, 2002). Através da via gastrointestinal, os glicosídeos são metabolizados pelas enzimas bacterianas no intestino e liberam as agliconas e gliconas (porção açúcar). Cerca de 15% dos flavonóides na forma de agliconas são absorvidos com as micelas da bile pelas células epiteliais e passam para a linfa. A eliminação dos flavonóides se dá pelas fezes e pela urina, sendo que o tempo de meia-vida de um flavonóide costuma estar em torno de 1 – 2 horas, e eles não são acumulados no organismo, assim como seus produtos de decomposição como ácidos caféico e cinâmico, e seus derivados (HAVSTEEN, 2002). Hollman e Katan (1999) e Hollman et al. (1999a), demonstraram que a quercetina glicosídeo foi melhor absorvida (52%) do que as agliconas isoladas (24%), mostrando que a metabolização gastrointestinal diminui a atividade sistêmica do flavonóide no organismo.

Dos flavonóides consumidos, a quercetina é a substância mais ingerida através da alimentação, sendo responsável por cerca de 95% do total de flavonóides ingeridos (HEO et al., 2001). A ela já foram atribuídas diversas atividades biológicas, como: antiinflamatória, analgésica, antiviral, antitumoral, cicatrizante e outras (HAVSTEEN, 1983).

Krizkova et al. (1998), afirmaram que os flavonóides como a crisina, tectocrisina, galangina, pinocembrina e pinobanksina apresentaram poderosa atividade antimutagênica em modelos experimentais, entretanto, a quercetina-3-metil-éter, quercetina-3,3'-dimetil-éter e o kaempferol não apresentaram tal atividade.

A galangina também é um flavonóide que está presente na própolis em concentrações consideráveis, à mesma, foram atribuídas às atividades, antimutagênica, anticlastogênica (evita a quebra de cromossomos) e antioxidante (HEO et al., 2001).

Além dos flavonóides, destacamos ainda nesta revisão de literatura, outros compostos de interesse na elucidação das atividades biológicas atribuídas à própolis. O ácido caféico fenetil éster (CAPE) é um antioxidante fenólico que está presente na composição química da própolis, sendo um dos constituintes responsáveis pela sua atividade antiinflamatória. Demonstrou-se que o CAPE inibe o NF- κ B, causa uma redução na produção de citocinas pró-inflamatórias e induz a apoptose em macrófagos (FITZPATRICK et al., 2001). A este constituinte também foram atribuídas as atividades antimicrobiana, antiinflamatória, antineoplásica e antioxidante (ETZENHOUSER et al., 2001).

Outros constituintes que têm despertado a atenção de pesquisadores japoneses são os compostos prenilados. Destes destacamos o artepilin C (ácido-3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), um componente que exibe atividade antibacteriana, antiviral, atividade indutora de apoptose em células de tumores

sólidos e em células leucêmicas em modelos “in vitro” (KIMOTO et al., 2000). O artepilin C é absorvido no estômago e sofre metabolização e excreção 48 horas após a administração oral. Apresenta baixa solubilidade em água. Pela sua forma de absorção, acredita-se que sofra metabolização de primeira passagem no fígado. Este constituinte demonstrou proteção renal em modelo experimental onde se induzia a carcinogênese deste órgão (KIMOTO et al., 2000).

Face aos resultados demonstrados, a veiculação da própolis em uma forma farmacêutica adequada pode constituir uma opção terapêutica vantajosa para os pacientes com lesões causadas por queimaduras, considerando suas propriedades antimicrobianas e cicatrizantes já estudadas.

2.2. Géis poliméricos

Para facilitar a veiculação do fármaco por diferentes vias de administração, formas farmacêuticas deverão ser formuladas e produzidas. Cada forma farmacêutica deve conter princípio ativo e também outras substâncias que permitam a obtenção do medicamento e proporcionem a administração e o alcance do efeito terapêutico desejado.

Os copolímeros de polioxietileno e polioxipropileno, conhecidos como Poloxamer ou Pluronic[®], têm sido muito utilizados na indústria como agentes dispersores, estabilizadores para sistemas emulsivos e solubilizantes. Trata-se de um copolímero não-iônico constituído de cadeias de polioxietileno e polioxipropileno. Possui 70% de óxido de etileno e 30% de óxido de propileno e massa molecular correspondente à 12500 Daltons. A sua fórmula molecular é $[\text{HO}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_{106}\text{-(CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-O)}_{70}\text{-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{106}\text{H}]$ podendo ser classificado quimicamente como um poliéter-álcool. O polímero possui caráter anfifílico, uma vez que possui uma cadeia de poli-óxido de propileno com caráter hidrofóbico e duas cadeias de poli-óxido de etileno com caráter hidrofílico. É um sólido branco com ponto de fusão correspondente a 56 °C, solúvel em água e capaz de formar um gel firme na concentração de 20% p/p a 25 °C (SCHMOLKA, 1972).

As soluções concentradas do copolímero apresentam geleificação termorreversível por ação da temperatura. Em solução aquosa a 20% p/p e com o aumento da temperatura, o copolímero agrega-se em micelas para minimizar a

energia livre da solução e muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar esse processo de formação de micelas. Em temperaturas baixas (5 °C) o polímero existe como um unímero livre em solução aquosa e com o aumento da temperatura estabelece-se um equilíbrio entre unímeros e micelas. Em temperaturas mais altas, como a temperatura corporal (37 °C) formam-se agregados de micelas aumentando a viscosidade, que passa de uma solução para um gel firme. As micelas apresentam uma estrutura esférica, onde a cadeia central de óxido de polipropileno (OPP) localiza-se no interior da micela, devido ao seu caráter hidrofóbico, e as duas cadeias laterais de óxido de polietileno (OPE) localizam-se no exterior da micela devido ao seu caráter hidrofílico (CABANA et al., 1997). As propriedades de termorreversibilidade e a atoxicidade tem tornado estes copolímeros bastante atrativos na formulação de géis para aplicação tópica, transdérmica, parenteral, oftálmica, considerando a possibilidade destes modificarem a liberação.

Modelos matemáticos demonstram que a degradação ou dissolução do gel modula a liberação do fármaco nele incorporado. Assim, quanto menor é a dissolução do gel, menor será a liberação do fármaco. Aumentando-se a concentração do fármaco aumenta-se também a difusão deste através do gel (MOORE et al., 2000).

Edsman et al. (1998) avaliaram as propriedades reológicas dos géis de copolímero não iônico determinando a temperatura de geleificação. O aumento da concentração do polímero resulta em aumento da firmeza e da elasticidade do gel e na diminuição da temperatura de geleificação. O processo de geleificação é

resultado da formação e da agregação de micelas que provoca mudança de estado físico de solução para um gel firme. O processo de agregação aumenta a interação entre as micelas tornando difícil a separação umas das outras e conferindo firmeza ao gel, que apresenta uma dissolução lenta em água. Os géis desse polímero são de natureza micelar e, assim, tanto fármacos hidrofílicos quanto hidrofóbicos podem ser facilmente incorporados. Na teoria, os fármacos hidrofílicos localizam-se na fase externa das micelas e os hidrofóbicos sofrem partilha entre o meio externo e interno das micelas. Estudos de liberação de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos a partir dos géis foram realizados e concluiu-se que a polaridade e a massa molecular dos fármacos não influenciaram a velocidade de liberação dos mesmos (MOORE et al., 2000). A localização dos fármacos na fase interna ou externa das micelas não interfere na liberação. O mecanismo de liberação obedece a uma cinética de pseudo ordem zero, dependendo apenas da dissolução do gel no meio receptor utilizado no teste de liberação. O aumento da concentração do polímero no gel e a incorporação de aditivos como sais inorgânicos e tampão podem alterar a dissolução do gel e a velocidade de liberação do fármaco (RICCI et al., 2002; FREITAS et al., 2006).

Ricci et al. (2002) e Freitas et al. (2006) demonstraram que os géis de poloxamer 407 são materiais pseudoplásticos e viscoelásticos, que apresentam módulo elástico, característico de sólidos e módulo viscoso, característico de líquidos. Em ambos os trabalhos, o aumento da concentração do polímero no gel aumentou a viscosidade dos sistemas, que afetou o processo de liberação de lidocaína e nimesulida, respectivamente.

Os estudos do perfil de liberação realizados para este tipo de sistema revelaram que a liberação do fármaco em meio aquoso e não aquoso seguem o modelo proposto por Higuchi (1962). Estes estudos também mostraram que o aumento da concentração do polímero diminuiu o coeficiente de difusão do fármaco no gel, o que já era esperado devido ao aumento da viscosidade. Entretanto, embora a viscosidade do gel aumente com o aumento da temperatura, a taxa de liberação do fármaco também aumenta com o aumento da temperatura. Este fato tem levado os autores a propor que a liberação do fármaco é controlada mais pela microviscosidade do gel do que pela viscosidade geral da matriz (MOORE et al., 2000).

Os membros do grupo de polímeros denominados Poloxamer, em especial o 407, são inertes e não causam lise das membranas celulares. Esse polímero não causa ruptura na membrana de hemácias, hepatócitos e linfócitos “in vitro”, em cultura de células, e “in vivo” quando injetados em organismos (JOHNSTON; MILLER, 1985). Estudos de histocompatibilidade foram conduzidos por Ricci et al. (2002). Os autores realizaram o estudo em modelo animal e concluíram que a injeção de uma formulação de lidocaína veiculada em gel de poloxamer 407, desencadeou processo inflamatório suave, que foi semelhante ao observado com a aplicação de soro fisiológico, assim, concluiu-se que o gel de poloxamer 407 apresenta biocompatibilidade conforme demonstrado por outros pesquisadores, já que o processo inflamatório desencadeado pode estar relacionado com a presença física de um material no meio tissular.

Li et al. (1996), efetuaram estudos farmacocinéticos do polímero em ratos, após administração de 300 mg do polímero por injeção intraperitoneal. Eles determinaram o tempo de meia-vida, que foi de 21 horas e o "clearance" renal que foi de 0,0024 L.h-1Kg-1 e quantificaram o polímero acumulado nos rins e fígado. A eliminação ocorre por reabsorção do polímero do local de administração para o plasma e posterior excreção renal por filtração glomerular.

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do produto “in vitro”

Os métodos de avaliação da atividade antimicrobiana “in vitro” são utilizados para uma triagem de substâncias com potencial utilização terapêutica e também para a determinação das prováveis concentrações inibitórias mínimas. A triagem “in vitro” fornece dados importantes para a realização dos estudos “in vivo”, já que é preciso ter em mente que a sensibilidade do microrganismo dependerá de diversos fatores biológicos no organismo, como, por exemplo, a capacidade do agente antimicrobiano atingir a área pretendida (WITEBSKY et al., 1979).

A concentração inibitória mínima (CIM) é considerada um bom método para a determinação da susceptibilidade de organismos aos antimicrobianos. CIM's são utilizadas em diagnósticos laboratoriais para confirmar resistência e resultados obtidos por outros métodos ou quando o método por difusão em disco é inapropriado. A CIM é definida como a menor concentração de uma droga capaz de inibir o crescimento visível de um organismo após 12 horas de incubação (este período é maior para organismos anaeróbios, que requerem um tempo de incubação maior para o crescimento) (ANDREWS, 2001).

Embora o método de difusão em ágar (disco) continue a ser o procedimento mais empregado para a determinação da susceptibilidade de microrganismos aos agentes antimicrobianos, há um crescente interesse nas metodologias capazes de fornecer informação quantitativa a respeito da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos para, pelo menos, alguns isolados clínicos. Este crescente

interesse é baseado no aumento da sofisticação no uso de agentes antimicrobianos e nos avanços no delineamento de equipamentos e de preparações de amostras para estes estudos quantitativos. O método de difusão em ágar é restrito a um sistema interpretativo que compreende duas ou três categorias, como sensível, intermediário e resistente. Os métodos de diluição em caldo e em ágar para determinação da concentração inibitória mínima têm sido usados através do emprego de técnicas de diluição seriada entre uma concentração máxima e mínima (WITEBSKY et al., 1979).

A técnica de microdiluição em microplacas é uma técnica de diluição em caldo que apresenta como vantagem a possibilidade de utilização de amostras diminutas e permite a avaliação de amostras que não se difundem adequadamente no método de difusão em ágar através da utilização de disco (ANDREWS, 2001; SUFFREDINI et al., 2004; SUFFREDINI et al., 2006). Pankuch et al. (2006), estudaram a atividade de retapamulin frente a *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* através dos métodos: diluição em ágar, microdiluição, E-teste e difusão em disco. Neste estudo, o grau de concordância entre os métodos de diluição em ágar e microdiluição foi de 99% para o *Staphylococcus aureus* e de 100% para o *S. pyogenes*, demonstrando assim, que a microdiluição é um método seguro.

O cloreto de trifeniltetrazólio é um composto utilizado para a avaliação da presença de células viáveis em um meio. O método se fundamenta na redução deste sal pelas células viáveis, sendo amplamente aceito como um método seguro e muito utilizado em cultura de células em técnica denominada de teste de

integridade de membrana (SONMEZ et al., 2005; FURTADO et al., 2002; LAI et al., 2004; SILVA et al., 2004). Desta forma, a técnica empregada na detecção de microrganismos viáveis na microplaca envolveu a utilização de cloreto de trifeniltetrazólio.

2.4 Avaliação da Atividade Cicatrizante “in vivo”

O processo normal de cura de um ferimento se inicia no momento em que o tecido é lesionado. Após a lesão, ocorre uma resposta inflamatória e as células abaixo da derme começam a aumentar a produção de colágeno. Mais tarde, o tecido epitelial é regenerado (NAYAK et al., 2006).

A cura do ferimento envolve uma série complexa de interações entre diferentes tipos celulares, mediadores, citocinas e a matriz extracelular. A fase de reparo normal do ferimento inclui hemostasia (interrupção da perda hemorrágica de vasos lesados), inflamação, proliferação e remodelação. Cada fase do reparo do ferimento é distinta, embora seja um processo contínuo, com cada fase se sobrepondo à próxima. O sucesso do processo de reparo requer adequado suprimento sanguíneo e de nutrientes na área afetada, pois o quadro geral do paciente influencia nas condições de adequada formação tissular. Os profissionais de saúde acreditam que os fatores que devam ser considerados abranjam desde fatores emocionais como físicos, incluindo o status nutricional e estados patológicos como diabetes, câncer e artrite. Alguns fatores clínicos que sabidamente impedem o adequado processo de reparo das lesões incluem hipóxia, infecção, tumor, desordens metabólicas como diabetes mellitus, presença de ‘debris’ e tecido necrótico, certos medicamentos, dieta deficiente em proteínas, vitaminas ou minerais (MACKAY; MILLER, 2003).

O objetivo na manutenção do processo é a promoção da cura da lesão no menor tempo possível, com a mínima dor e desconforto, e a cicatrização do paciente.

O ferimento desencadeia a resposta que primeiro envolve a retirada de tecidos desvitalizados e materiais estranhos, sinalizando para a próxima etapa, a cura do tecido e a regeneração. A resposta vascular inicial envolve um breve e transiente período de vasoconstrição e hemóstase. Um período de 5-10 minutos de intensa vasoconstrição é seguido por uma vasodilatação ativa acompanhada por um aumento na permeabilidade capilar. Plaquetas agregadas por dentro de um coágulo de fibrina secretam uma variedade de fatores de crescimento e citocinas que sinalizam para uma próxima fase ordenada por uma série de eventos que levam ao reparo tissular (MACKAY; MILLER, 2003).

A segunda etapa, a fase inflamatória, envolve eritema, inchaço, calor e é freqüentemente associada com dor. A resposta inflamatória aumenta a permeabilidade vascular, resultando na migração de neutrófilos e monócitos ao redor do tecido. Os neutrófilos englobam os tecidos desvitalizados e microorganismos, promovendo a primeira linha de defesa contra uma infecção. A migração neutrofílica cessa após os primeiros dias pós-lesão, se a mesma não estiver contaminada. Se esta fase de inflamação aguda persistir, devido a uma hipóxia do tecido, infecção, deficiência nutricional, uso de medicamentos ou outros fatores relacionados à imunidade do paciente, isso pode interferir com a fase inflamatória do paciente (MACKAY; MILLER, 2003).

No final da fase inflamatória, monócitos convertem-se no tecido a macrófagos, que digerem e matam bactérias patogênicas, seqüestram tecidos mortos e destroem neutrófilos remanescentes. Os macrófagos iniciam a transição do tecido inflamado ao reparo do ferimento pela secreção de uma variedade de fatores quimiotáticos e fatores de crescimento que estimulam a migração celular, proliferação e formação de matriz tissular (MACKAY; MILLER, 2003).

A fase seguinte envolve a formação de tecido de granulação e epitelização. Sua duração é dependente do tamanho da lesão. Fatores quimiotáticos e de crescimento liberados das plaquetas e macrófagos estimulam a migração e ativação de fibroblastos que produzem uma variedade de substâncias essenciais ao reparo tissular, incluindo glicosaminoglicanas (principalmente ácido hialurônico, sulfato de condroitina, sulfato de dermatan e sulfato de heparan) e colágeno. Isso forma um tecido matricial conectivo, amorfo, parecido com um gel, necessário para a migração celular. O crescimento de novos capilares deve acompanhar o avanço dos fibroblastos. A síntese de colágeno, forma ligações que são responsáveis pela integridade vascular e resistência ao leito dos vasos neoformados. Os níveis de colágeno aumentarão continuamente por aproximadamente três semanas, e essa quantidade determinará a resistência e tensão da lesão (MACKAY; MILLER, 2003).

A fase final é a remodelação, incluindo a reorganização das novas fibras de colágeno, que progressivamente continuará a aumentar a resistência do tecido. A remodelação é um processo que continua até por dois anos, sendo que de 40 – 70% do tecido até quatro semanas (MACKAY; MILLER, 2003).

Estudos histopatológicos em modelos de lesões tissulares podem nos demonstrar se determinadas substâncias são capazes de estimular o processo de reparo tissular e a qualidade do tecido neoformado. Os protocolos normalmente empregados podem avaliar a quantidade de tecido formado na área lesionada através de análise morfométrica, podem mensurar a quantidade de colágeno formado na área, podem avaliar a presença de células envolvidas nos processos inflamatórios ou de epitelização e o tempo de cicatrização do ferimento.

Assim, diversos experimentos já foram descritos na literatura sendo que os modelos envolvem desde experimentos que induzem uma queimadura no animal, como com água quente (EROGLU et al., 2004) ou chapa quente, ou através de lesões cirúrgicas envolvendo um “punch” (NAYAK et al., 2006; EROGLU et al., 2004; KJOLSETH et al., 1994) ou lesões químicas em córneas envolvendo substâncias alcalinas, dentre outros (OZTURK et al., 2000; OZTURK et al., 1999).

2.5 Avaliação do potencial genotóxico “in vivo”

O teste de micronúcleo (MN) é um teste recomendado para se estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (RIBEIRO et al., 2003) e, apresenta como vantagem, o fato de ser um método mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas. Este teste detecta agentes clastogênicos (que quebram o cromossomo) e agentes aneugênicos (induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (GOLLAPUDI; MACFADDEN, 1995; HAYASHI et al., 2000).

Os MNs, um ou vários por célula, oriundam de fragmentos cromossômicos acêntricos, resultantes de quebra ao acaso do genoma do animal (agente clastogênico) ou, cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula na anáfase (agente aneugênico). Os MNs aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parenterais. Os MNs formados a partir de um cromossomo inteiro por dano no aparelho mitótico da célula ou no próprio cromossomo, irão conter o centrômero do cromossomo, o qual pode ser detectado utilizando-se sondas específicas (CZYZEWSKA; MAZUR, 1995; RIBEIRO et al., 2003).

As características básicas do teste são: o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos (*polychromatic erythrocytes*, PCE), os quais possuem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer MN que contenham deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos

induzidos recentemente. Os eritroblastos, na medula óssea, sofrem uma duplicação final dos cromossomos, após a divisão, se diferenciam em eritrócitos policromáticos. Os MNs são facilmente identificáveis, a sua distribuição é bem definida e a frequência induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento gerado pelo agente químico, o qual será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO et al., 2003).

Os MNs são encontrados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo ao se transformarem em eritrócitos, os MNs permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Os PCEs migram para o sangue periférico e, durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (RNA-positivo), isto é, coram-se em azul e, depois tornam-se eritrócitos normocromáticos (*normochromatic erythrocytes*, NCE) ou maduros, e se coram em vermelho (CZYZEWSKA; MAZUR, 1995; DASS et al., 1997). São tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito. Corresponde ao que se denomina, em hematologia, de corpúsculo de Howell-Jolly. Os resultados positivos obtidos com o teste de micronúcleo fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas, os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo* (RIBEIRO et al., 2003).

A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (*polychromatica erythrocytes micronuclead*, PCEMNs), reflete o nível de danos induzidos no sistema hematopoiético (CZYZEWSKA; MAZUR, 1995).

Quanto aos animais, qualquer espécie de roedores é aceitável, ratos e camundongos são de maior preferência, porque neles se avalia a indução de micronúcleos gerados por uma grande variedade de agentes químicos. Tanto machos quanto fêmeas podem ser utilizados, desde que não existam diferenças de toxicidade entre os sexos (HAYASHI; TICE; MACGREGORM, 1994; HAYASHI et al. 2000; RIBEIRO et al., 2003).

2.6 Avaliação do tempo de cicatrização

Vários trabalhos já demonstraram que a pele queimada produz toxinas capazes de levar a uma disfunção no sistema imunológico, reduzindo os mecanismos de defesa. A remoção cirúrgica precoce da pele queimada contendo o complexo lipídico-protéico (debridamento) reduz a mortalidade e a morbidade nos pacientes portadores de trauma térmico (ALLGOWER et al., 1995).

Áreas doadoras nos pacientes queimados são de fundamental importância como fonte de enxertos de pele parcial para reconstrução dos pacientes queimados. A rapidez da reepitelização depende da espessura do enxerto, manutenção da área doadora com ausência de infecção e de um agente que promova a cicatrização. Quanto mais precoce for a reepitelização, mais rapidamente a área doadora poderá ser utilizada para uma segunda ou mais retiradas de enxerto de pele parcial.

A terapia antibacteriana tópica assume papel decisivo no controle das infecções, pois a destruição vascular ocorrida nas lesões tem como conseqüências a diminuição dos mecanismos de defesa humoral e celular na área queimada, e ainda a redução da eficácia dos antibacterianos sistêmicos, pela redução do transporte dos antibióticos ao local da infecção.

Na terapia para queimaduras, já foram empregados: nitrato de prata, na forma farmacêutica de solução aquosa a 0,5%, iodopovidona, em pomadas a 10%, mafenida, em creme a 10% p/v, ácido acético na concentração de 5% v/v, hipoclorito de sódio na concentração de 0,25%, clorexidina, em creme a 0,2% p/p,

gentamicina em creme ou pomada a 0,1% p/p (CERESER et al., 1995), mas, merece destaque a nitrofurazona e a sulfadiazina de prata.

A nitrofurazona, é usada em creme na concentração de 0,2% p/p, frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus* spp, mas não possui atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* ou fungos. Este princípio ativo tem seu efeito reduzido na presença de sangue e de matéria orgânica. Apresenta reações de sensibilização em cerca de 0,5 a 2,0% dos pacientes, e isto às vezes, dentro de poucos dias da aplicação inicial. É utilizada para promover rápida cicatrização de ferimentos e locais de enxertos da pele e para a prevenção de aderências peritoniais. Já a sulfadiazina de prata, é empregada na concentração de 1% p/p, em emulsões tópicas óleo em água, apresentando consagrado uso na profilaxia no tratamento de infecções. Apresenta amplo espectro de ação, incluindo bactérias gram positivas e negativas, fungos, protozoários e vírus. Esta substância apresenta pouca solubilidade em água e limitada absorção. Em pH fisiológico se dissocia lentamente liberando a sulfadiazina e íons prata, que exercem sua ação separadamente. Com relação às reações adversas, 2,5% dos pacientes podem ser acometidos com sintomas variados, como sensação de queimadura, urticária, prurido, nefrite, eritema multiforme, necrose cutânea e leucopenia (CERESER et al., 1995).

Além das áreas queimadas propriamente ditas, merecem atenção também os cuidados com as áreas doadoras. Os tratamentos para estes sítios variam de instituição para instituição, permanecendo ainda controversos. Um material para cobertura ideal para as áreas doadoras deve promover a cicatrização, causando

mínima dor ao paciente, prevenindo infecções, resultar em mínima cicatriz, de ter baixo custo e ser de fácil utilização (INNES et al., 2001). Neste sentido, Innes et al. (2001), propuseram o estudo de duas coberturas para a área: ALLEVYN[®], como produto controle e ACTICOAT[®], como produto teste. O ALLEVYN[®], é um produto a base de poliuretano hidrofílico composto por 3 camadas: poliuretano não-aderente (que entrará em contato com a lesão), região central hidrofílica absorvente e uma camada externa a base de poliuretano capaz de oferecer proteção frente a passagem de água e microrganismos. Já o ACTICOAT[®] é um material não aderente à base de prata microcristalina revestida que foi introduzida como uma cobertura para queimados. Essas propostas apresentaram vantagens frente aos sistemas convencionais de administração de fármacos, assim, existem fortes possibilidades de um sistema de liberação a base de poloxamer 407 contendo como substância ativa o extrato padronizado de própolis, um gel hidrofílico, termorreversível, de fácil aplicação e remoção, reduzir o tempo de cicatrização e favorecer a adesão do paciente ao tratamento.

A terapia atualmente utilizada na Unidade de Queimados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (HC-FMRP) para o tratamento das áreas doadoras consiste na utilização de morim ou rayon impregnado com pomada de nitrofurazona a 0,2% (Furacin[®]).

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

O objetivo deste trabalho foi realizar estudos pré-clínicos e clínicos de géis termorreversíveis contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) em diferentes concentrações de extrato seco de própolis para a cicatrização de pacientes queimados. O extrato padronizado de própolis e o gel foram desenvolvidos e caracterizados em trabalho anterior desenvolvido por Berretta (2003).

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Pesquisa Pré-clínica – Avaliação da eficácia e segurança

- a. Caracterização química do extrato de própolis (EEP-AF);
- b. Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana;
- c. Avaliação “in vivo” da atividade cicatrizante;
- d. Avaliação “in vivo” do potencial genotóxico.

3.2.2 Pesquisa Clínica – Avaliação da eficácia em seres humanos

- a. Avaliação do tempo de cicatrização de áreas doadoras de pacientes queimados, empregando-se o gel termorreversível contendo 3,6% de extrato padronizado de própolis (EPP-AF).

4. Material, Métodos e Casuística

4.1 Etapa pré-clínica

4.1.1 Materiais

4.1.1.1 Materiais e reagentes

Poloxamer 407 (Lutrol® F127); Óleo de rícino etoxilado (BASF); Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF; fornecido por Apis Flora Indl. Coml. Ltda. – Processo Pedido de Patente PI0405483-0); Água purificada; Pomada contendo 0,2% de Nitrofurazona (marca Furacin®); Rayon, Béquer; Espátula; Pipetas volumétricas de 5,0 mL; Balão volumétrico de 25 mL; Placas de Petri, meios de cultura Muller Hinton Agar (Difco – lote 3216559); Caldo de enriquecimento (Antibiótico Medium 3 – Difco – lote 2282569); Cloranfenicol (quermicetina 250 – Searle – lote F059); cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923; *Micrococcus luteus* ATCC 9341; cepa *Pseudomonas aeruginosa*; Solução salina estéril; Tubos de ensaio; Pipetas e micropipetas estéreis; Microplacas esterilizadas de 96 orifícios; Revelador cloreto de trifeniltetrazólio (Sigma); Anestésicos (ketamina, midazolan e acepran); Ciclofosfamida; Lâminas; Lamínulas; Seringas; Agulhas; “punch”; Béquer; espátula; Metanol PA (Synth); Cloreto de Alumínio PA (Quimis); Propilenoglicol (Galena).

4.1.1.2 Equipamentos

Agitador magnético marca Fisatom; Agitador de tubos marca Marte; Analisador de Imagens KS300 Zeiss (Axion Vision); Bomba de Vácuo marca Fisatom; Balança analítica AL500 marca Marte; Balança analítica AY 220 marca Shimadzu; Balança analítica mark 220; Banho termostatzado Tecnal; Capela fluxo laminar marca Veco FL-6646; Estufa de cultura bacteriológica Fanem; Estufa de Secagem Fanem; Destilador Marca Fanem; Espectrofotômetro marca Spectronic; Rotaevaporador marca Fisatom; Autoclave marca Phoenix; Microscópio óptico; pHmetro PH300 marca Analyser; Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência marca Shimadzu, SCL-10 Avp, 3 bombas LC-10AD, detector com arranjos de diodos modelo SPD-M10 Avp e software Shimadzu Class-VP versão 5.02. Coluna Shim-Pack CLC-ODS (M), shimadzu 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de 5 µm, diâmetro de poro de 100 Å; Refrigerador marca Cônsul.

4.1.1.3 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos do sexo masculino da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, com peso inicial de aproximadamente 45 g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP-USP).

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Obtenção do gel contendo própolis para o tratamento de queimaduras

O extrato padronizado de própolis (EPP-AF) foi fornecido pela Apis Flora Comercial e Industrial Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. O extrato foi obtido a partir da própolis padronizada (Patente número PI0405483-0, publicado na Revista de Propriedade Industrial n. 1778 de 01/02/2005). Obteve-se o extrato alcoólico (EEP) e o glicólico (EGP), sendo que o EGP foi obtido a partir do EEP após a evaporação da porção alcoólica e adição de propilenoglicol em quantidade suficiente para a obtenção do EGP concentrado cerca de 3 vezes, obtendo-se assim, o EGP a 30% p/v de extrato seco de própolis. Os géis estudados neste trabalho foram preparados em peso, conforme método a frio proposto por SCHMOLKA (1972). Quantidades apropriadas de Poloxamer 407 foram lentamente adicionadas à água purificada gelada (5°C) sob constante agitação. A dispersão do polímero foi mantida em refrigerador até a obtenção de uma solução límpida (6 – 12 horas). À dispersão de poloxamer, adicionaram-se quantidades de EGP 30% (EPP-AF) e óleo de rícino etoxilado, previamente homogeneizados, em quantidades suficientes para a obtenção de géis contendo 1,2; 2,4 e 3,6% p/v de extrato seco de própolis no produto final. Preparou-se amostras controle consistindo da dispersão do polímero em água e o óleo de rícino etoxilado (gel sem própolis). As formas farmacêuticas propostas foram previamente avaliadas

quanto às características reológicas, cinética de liberação, estabilidade física, química e microbiológica frente a condições de estresse drásticas ($40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $70\% \text{ UR} \pm 5\%$) durante seis meses de acompanhamento (BERRETTA, 2003).

4.1.2.2 Caracterização Química do Extrato Padronizado de Própolis

a. Quantificação de Polifenóis Totais no extrato padronizado de própolis

O teor de polifenóis totais foi determinado no extrato padronizado de própolis (EEP ou EGP) pelo método colorimétrico de Folin-Denis, onde 0,5 mL da amostra de EEP ou 0,5 mL de EGP foram transferidos para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume foi completado com água purificada. Transferiu-se então, 1,0 mL da solução previamente diluída de EEP ou 0,5 mL de EGP para um balão volumétrico de 50,0 mL onde se adicionou 2,5 mL de reagente de Folin-Denis e 5,0 mL de solução de Na_2CO_3 a 35%. Completou-se o volume do balão com água destilada e a absorbância foi obtida a 760 nm após 30 minutos de incubação da amostra em temperatura ambiente. Foi construída uma curva analítica com o padrão de referência secundário ácido gálico ($1\mu\text{g mL}^{-1}$ a $10\mu\text{g mL}^{-1}$) e o conteúdo de polifenóis totais foi expresso em mg/g (expressos em ácido gálico) (KUMAZAWA et al., 2004). As amostras foram analisadas em triplicata.

b. Quantificação de Flavonóides Totais no extrato padronizado de própolis

O teor de flavonóides totais foi determinado empregando-se o método colorimétrico após a reação dos flavonóides com cloreto de alumínio. Transferiu-

se 1,0 mL da amostra de EEP para um balão volumétrico de 10,0 mL e o volume foi completado com metanol. Desta solução, transferiu-se uma alíquota de 0,4 mL para um balão volumétrico de 25,0 mL contendo 5,0 mL de metanol. Adicionou-se 0,5 mL de uma solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio, e finalmente, completou-se o volume do balão com metanol. Para o EGP, transferiu-se uma alíquota de 0,5 g para um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume foi completado com metanol. Desta solução, 0,5 mL foi transferido para um balão de 25,0 mL contendo 5,0 mL de metanol. Adicionou-se 0,5 mL de uma solução metanólica a 2% de AlCl_3 e completou-se o volume do balão com metanol. Após 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, fez-se a leitura a 425 nm. Foi construída uma curva analítica com o padrão de referência secundário quercetina ($1\mu\text{g mL}^{-1}$ a $10\mu\text{g mL}^{-1}$) e o conteúdo de flavonóides totais foi calculado como quercetina em mg/g (KUMAZAWA et al., 2004). As amostras foram analisadas em triplicata.

c. Perfil Químico do Extrato Padronizado de Própolis por CLAE

A análise cromatográfica do extrato de própolis foi realizado utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu, equipado com controlador SCL-10 Avp, 3 bombas LC-10AD, detector com arranjo de diodos modelo SPD-M10 Avp e software Shimadzu Class-VP versão 5.02. Foi utilizada coluna Shim-Pack CLC-ODS (M), Shimadzu 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula de $5\mu\text{m}$, diâmetro de poro de 100 Å. A fase móvel utilizada foi na bomba A uma solução tampão (93,9% de água, 0,8% de ácido acético, 0,3% de acetato de amônia e 5% de metanol) e acetonitrila na bomba B. A eluição foi realizada utilizando um gradiente de 25-100% de B em 60 minutos a um fluxo de 1,0 mL/min. A detecção

foi realizada no comprimento de onda de 280 nm. Os compostos fenólicos foram identificados por comparação com padrões cromatográficos disponíveis no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, comparando-se o espectro UV e considerando o λ máximo e a área relativa obtida com o uso de 2 comprimentos de onda ($A_{280/320}$).

O extrato de própolis foi dissolvido em metanol (grau HPLC) para obter a concentração de 1 mg/mL. Antes da análise, todas as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm e filtrados através de um filtro de 45 μ m.

4.1.2.3 Avaliação “in vitro” da atividade antimicrobiana

a. Microrganismos utilizados e preparo dos inóculos

Foram utilizadas as cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923, *Micrococcus luteus* ATCC 9.341 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27.853. Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, as cepas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de salina esterilizada. As suspensões dos microrganismos foram padronizadas comparando-se com a escala 1 de MacFarland (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0% - aproximadamente $4,8 \times 10^9$ UFC/mL) sendo que foram realizadas diluições seriadas até a obtenção de aproximadamente $4,8 \times 10^3$ UFC/mL. Realizou-se a contagem do número de UFC/mL em placas de Petri contendo Müller Hinton Agar

(DIFCO) para a última diluição e confirmação do número mais provável de microrganismos.

b. Difusão em ágar

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica da difusão em ágar para os extratos EEP, EGP 30%, 1,2%, 2,4% e 3,6%, e também para os géis nas três concentrações de extrato seco de própolis propostas nesse trabalho (1,2%; 2,4% e 3,6%p/v). O ensaio foi realizado utilizando-se placas de Petri contendo meio de cultura e discos de papéis de filtro com 6 mm de diâmetro (n=3).

As alíquotas de culturas jovens dos microrganismos indicadores (37 °C por 24h) semeadas em Müller Hinton Broth foram transferidas para Muller Hinton Agar a aproximadamente 50 °C. Cerca de 20 mL de meio de cultura com inóculo foram transferidos para as placas de Petri (20 x 100 mm), com auxílio de pipetas esterilizadas através da técnica de “pour-plate”. Decorrida a solidificação dos meios de cultura, os discos de papel de filtro foram embebidos com as amostras e aplicados na superfície das placas, com auxílio de pinças estéreis. As placas permaneceram a temperatura ambiente por 30 minutos (período de pré-incubação) e depois, foram incubadas invertidas a 37 °C por 24h. A leitura foi realizada após o período de incubação, onde se mensurou os halos de inibição do crescimento microbiano ao redor dos discos de papel de filtro com as amostras em milímetros.

c. Microdiluição em Microplacas

Preparo das amostras

Foram preparadas três diluições do gel contendo extrato de própolis a 3,6% p/v de extrato seco de própolis - GEP) em solução salina, sendo que a primeira diluição obtida foi 1:2; a segunda 1:4 e a última 1:8. Foram utilizadas as alíquotas de 20 µL e 40 µL, para cada tubo nos protocolos experimentais, sendo as concentrações finais de gel por orifício da microplaca, respectivamente: 10µg; 5µg e 2,5 µg, para as alíquotas de 20 µL; e 20 µg; 10 µg e 5 µg, para as alíquotas de 40 µL de amostra.

Determinação da atividade antimicrobiana dos géis contendo própolis

Em microplacas esterilizadas de 96 orifícios foram depositados um total de 100 µL da mistura envolvendo: Müller Hinton Broth (DIFCO), soluções do gel contendo 3,6% de extrato seco de própolis (GEP) (diluições 1:2; 1:4 e 1:8) e suspensões dos microrganismos preparadas a aproximadamente $4,8 \times 10^3$ UFC/mL. Foi determinada a concentração inibitória mínima do gel que inibiu o crescimento em uma menor concentração, utilizando-se o método de microdiluição em microplaca (FURTADO et al., 2002; LAI et al., 2004; SILVA et al., 2004; ANDREWS, 2001).

Em um dos orifícios de cada placa foi realizado o controle da cultura, a qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano. Em outro orifício foi efetuado o controle de esterilidade do caldo de

enriquecimento e, em outro, o controle do método, onde se utilizou o inóculo dos microrganismos na presença de um agente antimicrobiano, cloranfenicol a 1% em etanol (QUERMICETINA 250).

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 20 µL de solução aquosa de cloreto de trifeniltetrazólio (SIGMA) preparado a 2 mg/mL. As microplacas foram reincubadas por 30 minutos, sendo então observado o aparecimento de cor. A ausência de cor nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento microbiano (microrganismo sensível) (FURTADO et al., 2002; LAI et al., 2004; SILVA et al., 2004).

A análise foi realizada em três microplacas, sendo que na primeira avaliou-se o produto frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. Na segunda, repetiram-se os ensaios da primeira placa, para os mesmos microrganismos e acrescentou-se na avaliação das amostras a inibição do agente conservante (sorbato de potássio), já que este poderia ser o responsável pela atividade antimicrobiana encontrada. Para maior compreensão do trabalho, apresentamos os quadros seguintes que resumem o protocolo experimental executado.

Na terceira placa, avaliou-se a atividade antimicrobiana do produto frente ao microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, e também avaliamos a atividade frente à inativação do agente conservante, a exemplo da placa 2.

Quadro 01 – Representação do protocolo experimental para atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (*) e *Micrococcus luteus* (**) através da técnica de microdiluição em microplaca, utilizando-se como revelador o cloreto de trifeniltetrazólio.

Ident. linhas	Orifício Constituintes	01	02	03	04	05	06	07
A	Caldo	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL	80 µL	100 µL	60 µL
	Cepa (*)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	-	20 µL
	Produto	20 µL salina	20 µL (GEP 1:2)	20 µL (GEP 1:4)	20 µL (GEP 1:8)	-	-	20 µL CLOR
	Conc. gel	-	10 µg	5 µg	2,5 µg	-	-	-
C	Caldo	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	80 µL	100 µL	40 µL
	Cepa (*)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	-	20 µL
	Produto	40 µL salina	40 µL (GEP 1:2)	40 µL (GEP 1:4)	40 µL (GEP 1:8)	-	-	40 µL CLOR
	Conc. gel	-	20 µg	10 µg	5 µg	-	-	-
E	Caldo	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL	60 µL
	Cepa (**)	20µ L	20µ L	20µ L	20µ L	20µ L	-	20µ L
	Produto	20 µL salina	20 µL (GEP 1:2)	20 µL (GEP 1:4)	20 µL (GEP 1:8)	-	-	20 µL CLOR
	Conc. gel	-	10 µg	5 µg	2,5 µg	-	-	-
G	Caldo	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL	80 µL	100 µL	40 µL
	Cepa (**)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	-	20 µL
	Produto	40 µL salina	40 µL (GEP 1:2)	40 µL (GEP 1:4)	40 µL (GEP 1:8)	-	-	40 µL CLOR
	Conc. gel	-	20 µg	10 µg	5 µg	-	-	-

Quadro 02 – Representação esquemática do protocolo experimental para atividade antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*, na presença do inibidor do sistema conservante utilizado no produto, através da técnica de microdiluição em microplaca, utilizando-se como revelador o cloreto de trifeniltetrazólio.

Ident. Linhas	Orifício Constit.	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
A	Caldo (µL)	60	60	60	60	80	100	60	-	-	-
	Cepa (*) (µL)	20	20	20	20	20	-	20	-	-	-
	Produto (µL)	20	20	20	20	-	-	20	-	-	-
	salina		(**)(1:2)	(***) (1:4)	(***) (1:8)			CLOR			
B	Caldo (µL)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	Cepa (*) (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	Produto (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20 cons.	20 cons.	20 cons.
		(#) (1:2)	(#) (1:4)	(#) (1:8)	Cons.. 0,1%	Cons. 0,1% (1:2)	Cons. 0,1% (1:4)	Cons. 0,1% (1:8)	+ sist. Inibidor (1:2)	+ sist. Inibidor (1:4)	+ sist. Inibidor (1:8)

Staphylococcus aureus (*) ; GEP (***) ; GEP na presença do inibidor do sistema conservante (#)

As linhas C e D da microplaca correspondem respectivamente às linhas A e B, sendo que a diferença está na quantidade de produto e do meio de cultura, que passa a ser 40 uL.

As linhas E, F, G e H, correspondem respectivamente às linhas A, B, C e D, sendo que somente se alterou o microorganismo para *Micrococcus luteus*.

4.1.2.4 Avaliação “in vivo” da Atividade Cicatrizante

a. Preparo da lesão em pele de rato

Para a realização dos experimentos foram utilizados 30 ratos do sexo masculino da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, com peso inicial de 45 g de peso corpóreo. Realizou-se uma incisão cirúrgica utilizando-se um “punch” para biópsia, em ambiente estéril, de 0,6 cm de diâmetro / 2 mm de profundidade, conforme apresentado na Figura 01. Os animais foram anestesiados previamente com 0,075 mL de copazine associada a 0,038 mL de ketamina e assepsia com álcool iodado a 3% (HU et al., 1998; NAYAK et al., 2006; EROGLU et al., 2004; KJOLSETH et al., 1994). Após a cirurgia os animais não receberam nenhum tratamento adicional (ex. antibióticos ou antiinflamatórios), apenas água e alimentação *ad libitum*. As gaiolas foram limpas diariamente e mantidas em ambiente climatizado.

b. Grupos experimentais

Avaliou-se o processo de cicatrização obtido com dois protocolos experimentais. No primeiro, houve aplicação única do produto em teste, sendo que os animais foram sacrificados após três dias da realização da incisão cirúrgica (n=3). No segundo protocolo, houve aplicação dos produtos em teste, duas vezes ao dia, ou seja, de 12 em 12 horas, sendo que os animais também foram sacrificados com três dias após a incisão cirúrgica (n=3).

Para a realização dos experimentos, as concentrações de extrato

padronizado de própolis (EPP-AF) nos géis foram: 1,2%, 2,4% e 3,6% p/v de extrato seco. Além dos animais tratados com géis contendo diferentes concentrações de própolis, também foram realizados grupos de animais tratados com gel sem própolis (dispersão do polímero com óleo de rícino etoxilado) e o grupo controle, que não recebeu nenhum tratamento (solução fisiológica).

Figura 01 – Fotografia apresentando o animal com a lesão de 0,5 cm de diâmetro / 2 mm de profundidade, provocada pela utilização de um “punch” para biópsia.

c. Preparo das amostras

Os animais foram sacrificados com doses letais de anestésico e os tecidos contendo as lesões foram fixados em formaldeído a 4% em tampão fosfato de Sorensen (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 em água destilada, 0,1M, pH 7.3), processados como de rotina para parafina. Os cortes de 6 μm de espessura foram corados Tricrômico de Masson e analisados pela microscopia óptica.

d. Morfometria

As micromensurações da área afetada foram realizados utilizando 3 cortes por rato com distância de 25 μm entre cada corte, totalizando 265 μm por tratamento. Foi morfometrada a área de preenchimento da lesão em todos os grupos e tratamentos conforme demonstrado nas Figuras 02 e 03, através de um analisador de imagens KS300 – Zeiss (Axion Vision) com aumento de 40x. Os resultados são apresentados na forma de média de tecido de preenchimento por μm .

Figura 02 : Pele normal antes da produção da lesão. Coloração de HE, aumento de 100x.

(1) o tecido epitelial de revestimento;

(2) região subcutânea, área de pêlos;

(3) região subcutânea, área de tecido adiposo.

Figura 03 : Ilustração de pele normal e lesada esquematizando o local morfometrado. A morfometria da profundidade da ferida foi realizada na região descrita nas figuras 3 **b** e 3 **c** (→). Sendo (**a**), o tecido normal anterior a realização da lesão e 3 **b** (região do controle após a lesão) e 3 **c** (região das lesões após o tratamento). As indicações 1, 2 e 3 correspondem às áreas apresentadas na Figura 02.

4.1.2.5 Avaliação “in vivo” do potencial genotóxico do produto

Para a realização dos experimentos foram utilizados 30 ratos do sexo masculino da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, com peso inicial de 45 g de peso corpóreo (p.c.), divididos em três tempos de tratamentos: agudo (24 horas), subagudo (7 dias) e crônico (30 dias), procedentes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

Como o gel do presente trabalho se destina ao tratamento de lesões originadas de queimaduras, os animais foram submetidos à lesão dorsal, com o aparelho “punch” (Figura 01), utilizando previamente anestésico (ketamina, midazolan e acepran) administrados pela via intraperitoneal (HU et al., 1998).

As concentrações do gel contendo própolis bem como o protocolo de tratamento, foram determinados de acordo com os estudos histológicos da ação do gel sobre a cicatrização, realizados anteriormente. Para a realização dos experimentos, as concentrações de própolis nos géis foram: 1,2%, 2,4% e 3,6% p/v. Além dos animais tratados com géis contendo diferentes concentrações de própolis, também foram realizados grupos de animais tratados com gel sem própolis, controle negativo e o controle positivo (ciclofosfamida, 50 mg/kg p.c., intraperitoneal). Para cada grupo de tratamento foram utilizados cinco animais. Estes grupos de tratamento foram submetidos à exposição aguda, subaguda e crônica com gel, com ou sem própolis, tratados diariamente.

Para a obtenção de micronúcleo (MN) de sangue periférico de ratos Wistar foi utilizada a técnica de Schmid (1973). Os esfregaços de sangue periférico

foram realizados 24 horas, 7 dias e 30 dias após o início da aplicação dos géis contendo diferentes concentrações de própolis nas lesões dorsais dos animais. A frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) foi obtida a partir da análise de 2000 eritrócitos policromáticos anucleados (PCE) por animal.

As diferenças nas frequências de PCEMNs entre os grupos de tratamento com o gel contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, foram analisadas estatisticamente pelo método de Turkey com o nível de significância igual a $\alpha=0,05$, nos três tempos de exposição.

4.2. ETAPA CLÍNICA

4.2.1 Casuística

Todas as etapas da pesquisa foram realizadas na Unidade de Queimados do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – FMRP-USP, sob a orientação do cirurgião plástico Dr. Werther Guilherme Marchesan. Toda a metodologia empregada faz parte dos procedimentos de rotina na referida unidade, e são reconhecidos internacionalmente pela literatura disponível (MACGREGOR, et al., 1987; HAYASHI, et al., 1994). O protocolo de pesquisa clínica foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Clínica, conforme Anexo VII, seguindo de acordo com as normas éticas do Conselho Nacional de Saúde (CNS, n. 196, de 10/10/1996).

Os pacientes foram selecionados, acompanhados e avaliados pela equipe da unidade de queimados. Foram ainda, esclarecidos e orientados a respeito dos objetivos e métodos da pesquisa, conforme entrevista (ANEXO I), e orientação apresentada no Anexo II, assinando, inclusive, o termo de consentimento (conforme Anexo III).

Os pacientes receberam também orientações para que as áreas doadoras em estudo permanecessem sem manuseios, para que o ‘morin’ ou ‘rayon’ impregnado com os medicamentos não sofressem interferências no tempo de desprendimento, objetos deste estudo.

Foram selecionados 31 pacientes abrangendo crianças e adultos, de ambos os sexos e independentes da raça.

4.2.2 Material

Morim ou rayon, pomada de nitrofurazona 0,2% p/p (Furacin[®]), gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis EPP-AF 3,6%p/v (fornecido pela empresa Apis Flora Indl. Coml. Ltda.), gaze para queimados, esparadrapo.

4.2.3 Equipamentos

Dermatômetro elétrico de Padget e máquina fotográfica digital, marca Sony, modelo 5.1 mega pixels.

4.2.4 Método

A área doadora foi escolhida para o estudo, em função da espessura da pele ser conhecida e simular uma queimadura de 2º grau, pois nas áreas queimadas, é muito difícil de mensurar o grau de profundidade e de se obter homogeneidade da lesão para estudo. Ainda, além da calibração específica do dermatômetro, a pressão colocada pelo cirurgião, bem como o ângulo entre o dermatômetro e a área doadora, são fatores que influenciam na espessura da pele

para enxerto. Assim, para evitar esta variação, a retirada do enxerto foi realizada sempre pelo mesmo cirurgião (MACGREGOR et al., 1987).

Cada paciente que participou do estudo recebeu uma identificação numérica em uma lista onde constava a identificação das áreas como A ou B, e o que havia sido utilizado em cada área (conforme lista apresentada no Anexo V) e também uma ficha com todos os dados e também para registro de efeitos indesejados (Anexo IV). A utilização de rayon contendo nitrofurazona ou própolis nas áreas doadoras foi efetuada de modo aleatório. Deste modo, nem os médicos que avaliaram os pacientes e nem os pacientes, sabiam qual identificação correspondia ao medicamento controle e ao teste (estudo duplo-cego), somente a pesquisadora detinha estas informações para posterior avaliação dos resultados. A planilha para avaliação diária dos pacientes, continha apenas identificação numérica dos mesmos (Anexo VI)

Foi efetuado acompanhamento diário da equipe para observar o aspecto e desprendimento das gazes impregnadas com o medicamento teste ou controle, sendo que tais informações foram registradas diariamente nos documentos da pesquisa.

O tempo de reepitelização da área doadora será determinado quando a gaze impregnada com o medicamento se desprender completamente do corpo do paciente de forma espontânea (HAYASHI et al., 1994) e esse processo será documentado através de fotografia digital.

Quadro 03: Quadro ilustrativo dos grupos de estudo

ADULTOS (acima de 12 anos)	
Grupos de Área Doadora	Espessura dermatômetro
Grupo I – couro cabeludo	6 milésimos de polegada a 8 milésimos de polegada
Grupo II – membros superiores	8 milésimos de polegada a 12 milésimos de polegada
Grupo III – coxas	8 milésimos de polegada a 12 milésimos de polegada
CRIANÇAS (2 - 12 anos)	
Grupos de Área Doadora	Espessura dermatômetro
Grupo I – couro cabeludo	6 milésimos de polegada a 8 milésimos de polegada
Grupo II – membros superiores	8 milésimos de polegada a 12 milésimos de polegada
Grupo III – coxas	8 milésimos de polegada a 12 milésimos de polegada

5. Resultados e Discussão

Os produtos naturais têm sido utilizados há centenas de anos pela medicina popular para diversos propósitos. Dentre eles está a própolis, produto resinoso resultante da coleta e exsudatos de várias plantas pelas abelhas, que a utilizam para a defesa da colméia (PARK et al., 2004). Nos últimos anos, a própolis tem ganhado popularidade como um composto saudável, sendo utilizada extensivamente em alimentos e bebidas e também por proporcionar benefícios a saúde humana prevenindo doenças como inflamação, cardiopatias, diabetes e até mesmo o câncer (BANSKOTA et al., 2001).

A própolis tem sido usada como um agente terapêutico pela população mundial desde os tempos de Hipócrates. Já se sabe que o extrato etanólico de própolis apresenta atividade antimicrobiana, antiviral, antifúngica, antiinflamatória, anestésica e citostática. Um grande número de trabalhos tem demonstrado a atividade antimicrobiana da própolis contra vários microrganismos patogênicos (MARTINS et al., 2002), destacando-se também a atividade antifúngica, especialmente em relação a várias espécies de *Candida*, inclusive *C. albicans* em estudos realizados in vitro (FERNANDES et al., 1995) e in vivo, conforme demonstrado nos trabalhos de candidíase oral em pacientes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) (AZEVEDO et al., 1999) e em pacientes aidéticos (MARTINS et al., 2002).

Inúmeros compostos já foram identificados na própolis, porém, até o momento, as suas propriedades farmacológicas, especialmente as relacionadas à atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante, foram principalmente atribuídas à presença dos flavonóides e compostos fenólicos. Já é comprovado

cientificamente que os flavonóides reduzem a peroxidação lipídica não somente pela prevenção ou retardo do início da necrose celular, mas também pelo aumento da vascularização. Acredita-se que qualquer droga que iniba a peroxidação lipídica aumente a viabilidade das fibras de colágeno pelo aumento da resistência das mesmas, aumentando a circulação, prevenindo o dano celular e pela promoção da síntese celular (NAYAK et al., 2006). Ainda, os flavonóides e triterpenóides também são conhecidos por promoverem um processo de cura de ferimentos principalmente devido as suas características adstringentes e antimicrobianas, que parecem ser responsáveis pela contração da lesão e aumento da taxa de epitelização (NAYAK et al., 2006).

Orsolic et al. (2007) atribuíram aos flavonóides e compostos fenólicos encontrados na própolis as atividades antioxidantes, relacionadas a capacidade destas de quelar íons metálicos, seqüestrar oxigênio singlete, ânions superóxido, radicais peroxila, dentre outros radicais livres, além de aumentar a produção de moléculas capazes de proteger contra o estresse oxidativo.

Em função dessas características dos compostos fenólicos/flavonóides, elegeu-se tais substâncias como parâmetros de qualidade dos insumos utilizados nesse trabalho.

Por muitas décadas o tratamento de afecções e/ou lesões da pele, agudas ou crônicas, vêm sendo realizado por meio de formas farmacêuticas convencionais como as pomadas, os cremes, as loções, os géis e as soluções tópicas. Estas formas correspondem aos produtos farmacêuticos mais prescritos

e são conhecidos por promover liberação imediata do fármaco veiculado, além de seus efeitos físicos como protetores, cicatrizantes, umectantes e emolientes. Dessa forma, para manter o fármaco na concentração terapêutica torna-se necessário à administração reiterada (CHIEN, 1992; ANSEL, 2000).

Sistemas capazes de modificar a liberação do fármaco promovendo a liberação em quantidades adequadas e em uma determinada área estão sendo estudados, já que possuem vantagens sobre os sistemas convencionais tais como a manutenção de níveis terapêuticos ótimos com mínimo de flutuações, a redução dos efeitos colaterais, a diminuição da frequência de administração e o direcionamento do fármaco para sítios de ação específicos (MADAN, 1985). Madan (1985) define os sistemas de liberação sustentada como formas farmacêuticas que liberam rapidamente uma fração da dose total levando a uma resposta terapêutica rápida, e posteriormente mantém esta resposta por um período de tempo prolongado.

Partindo-se de trabalhos preliminares a respeito das atividades biológicas da própolis, avaliou-se uma forma farmacêutica de liberação sustentada, moderna e capaz de evitar a reaplicação constante do produto, auxiliando, desta forma, a adesão do paciente ao tratamento. Assim, associou-se o conhecimento da atividade cicatrizante, antimicrobiana e antiinflamatória da própolis aos benefícios biológicos propostos por Schmolka (1972) para o Poloxamer 407, visando a obtenção de um produto seguro e eficiente para a cicatrização de lesões de pacientes queimados.

5.1 Caracterização Química da Própolis

O desenvolvimento de formas farmacêuticas traz em seu conceito a obtenção de produtos padronizados e capazes de serem reprodutíveis e semelhantes lote a lote. O emprego de produtos naturais na área farmacêutica está em franca ascensão em função dos avanços nos processos extrativos, de purificação, isolamento e identificação de novos compostos e também das crescentes demonstrações científicas de segurança bem como das atividades biológicas e terapêuticas dos mesmos. O interesse científico associado a tendências de consumo mercadológico mundiais culminam com o crescimento do mercado de medicamentos empregando substâncias naturais.

Assim, quando se pretende desenvolver um sistema de liberação envolvendo a veiculação do extrato de própolis, não há como desconsiderar a padronização e a caracterização do mesmo. Com essa premissa, adquiriu-se o extrato alcoólico e glicólico de própolis padronizado (EPP-AF), protegido através de um processo de patente e, independente da padronização empregada pelo fabricante, avaliou-se o teor de extrato seco de própolis nos insumos, bem como o de flavonóides totais expressos em quercetina e o conteúdo de compostos polifenólicos totais.

O método para a quantificação de flavonóides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonóides, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções. Desta forma, é

possível determinar a quantidade de flavonóides na amostra, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente a dos ácidos fenólicos (FUNARI; FERRO, 2006; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 2003; WOISKY; SALATINO, 1998).

O método utilizado para o cálculo do teor de substâncias fenólicas totais baseia-se em uma reação de óxido-redução, na qual o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente a 760 nm. O preparo do reagente de Folin-Denis é bastante simples e este é o método mais comumente utilizado para doseamento de fenóis totais (WATERMAN; MOLE, 1994).

Para a determinação do teor de polifenóis e flavonóides no EEP e EGP foram construídas curvas analíticas utilizando-se ácido gálico e quercetina como padrões de referência secundário, respectivamente. O teor de polifenóis foi determinado através da equação $y = 0,0872x + 0,0618$ ($r = 0,9978$) e o teor de flavonóides foi determinado através da equação $y = 0,0706x + 0,0191$ ($r = 0,9992$), considerando-se ainda para o cálculo, as diluições empregadas. Os resultados encontrados para os extratos demonstram que não houve perda de compostos flavonóides em quercetina e de compostos fenólicos totais durante o processo de concentração na obtenção do extrato glicólico (que envolveu o controle da temperatura e pressão), pois, conforme demonstrado na Tabela 01, os resultados encontrados estão compatíveis com o esperado. Usando como referência os dados do extrato alcoólico, espera-se para o glicólico contendo 29,06% p/v de

extrato seco, 58,87 mg/mL de compostos fenólicos totais e 13,06 mg/mL de flavonóides. Assim, observamos pelos resultados encontrados, correspondentes a 65,52 mg/mL e 13,35 mg/mL, respectivamente, que o processo produtivo não ocasiona a degradação destas substâncias.

Funari e Ferro (2006) avaliaram amostras de própolis *in natura*, empregando os mesmos métodos analíticos utilizados no presente trabalho, para a quantificação de flavonóides totais em quercetina e de compostos fenólicos totais. Os resultados encontrados para a matéria-prima bruta, foram de $2,641\% \pm 0,002$ e $7,39\% \pm 0,011$, respectivamente e estão de acordo com os dados encontrados para a própolis bruta empregada na produção do extrato alcoólico utilizado nesta pesquisa (dados não apresentados). Marquele et al. (2005) e Orsolic et al. (2007), utilizaram como padrões de referência em seus trabalhos os mesmos grupos químicos apresentados, ou seja, compostos fenólicos e flavonóides totais, corroborando a nossa escolha que se fundamenta nas atividades propostas para tais grupos químicos, principalmente a atividade antioxidante, que acredita-se estar fortemente relacionadas a atividade antiinflamatória e cicatrizante da própolis (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997).

Tabela 01 – Caracterização do Extrato Padronizado de Própolis (EEP e EGP), utilizados no presente estudo. Os resultados correspondem a média de três determinações e estão expressos como a média $\pm$ desvio padrão).

Parâmetros avaliados	Amostras	
	Extrato de Própolis 11% p/v (EEP)	Extrato glicólico de Própolis 30% p/v (EGP)
Extrato seco (%p/v)	11,70 $\pm$ 0,128	29,06 $\pm$ 0,147
Compostos polifenólicos totais (mg/mL)	23,70 $\pm$ 0,283	65,54 $\pm$ 1,186
Flavonóides totais em quercetina (mg/mL)	5,26 $\pm$ 0,067	13,35 $\pm$ 0,119

Figura 04 : Perfil cromatográfico do extrato de própolis obtidos por CLAE: (1) ácido p-cumárico, (2) aromadendrina, (3) drupanin, (4) artepilin C e (5) baccharina. A análise cromatográfica realizada num tempo total de 60 minutos iniciou-se com um gradiente envolvendo mistura de ácido acético, acetato de amônio em metanol/água e acetonitrila, finalizando com 100% de acetonitrila com fluxo de 1,0 mL/min.

A análise cromatográfica permitiu a obtenção do perfil químico da própolis, onde foram identificados: (1) ácido *p*-cumárico; (2) aromadendrina-4'-metil éter; (3) ácido 3-prenil-*p*-cumárico (drupanin); (4) ácido 3,5-diprenil-*p*-cumárico (artepilin C) e (5) baccharina, conforme apresentado na Figura 04.

Os géis obtidos com a adição de EGP 30% em formulações constituídas por Poloxamer 407, apresentaram-se límpidos, de coloração âmbar, na forma física líquida quando a baixas temperaturas, e geleificados, a temperatura controlada de 25 °C, para os géis contendo 2,4 e 3,6% p/v de extrato seco de própolis. Os estudos de caracterização reológica das formulações demonstraram que as amostras apresentaram propriedades viscoelásticas e que a liberação seguiu uma cinética de ordem-zero. As três preparações obtidas apresentaram estabilidade química, física e microbiológica, sendo a avaliação realizada durante seis meses, em câmara climática a $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $75 \pm 5\%$ UR (BERRETTA, 2003).

5.2 Avaliação “in vitro” da Atividade Antimicrobiana

a. Difusão em ágar

O estudo de atividade antimicrobiana através de difusão em ágar foi realizado para EEP e EGP. Além disso, também avaliou-se o halo de inibição obtido com os extratos glicólicos nas concentrações de própolis semelhantes aos géis desenvolvidos, ou seja, 1,2 % p/v; 2,4 % e 3,6 % p/v. A aplicação direta dos géis não foi adequada em função, provavelmente, da não difusão do produto sobre o ágar (resultados não demonstrados). Assim, realizamos o teste em veículo glicólico reproduzindo as concentrações finais de princípio ativo contidas na forma farmacêutica desenvolvida.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 02, verificamos que todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana frente ao microrganismo patogênico *Staphylococcus aureus* e um microrganismo indicador, *Micrococcus luteus*.

Não se observa, no entanto, correlação com as concentrações de extrato seco das amostras, provavelmente em função da maior concentração e viscosidade das amostras de EEP e EGP, que dificulta a plena difusão pelo agar.

Tabela 02 – Resultados obtidos na avaliação “in vitro” de atividade antimicrobiana através de técnica de difusão em ágar (mm) para os extratos avaliados e da concentração de própolis utilizada nos géis (n=3).

Amostras	Microrganismos	
	<i>S. aureus</i> (média $\pm$ SD)	<i>M. luteus</i> (média $\pm$ SD)
EEP 11% p/v	24,67 $\pm$ 3,21	22,33 $\pm$ 4,04
EGP 30%	22,67 $\pm$ 3,06	23,67 $\pm$ 3,06
EGP 1,2%	14,0 $\pm$ 0,0	17,0 $\pm$ 2,65
EGP 2,4%	15,33 $\pm$ 1,53	18,33 $\pm$ 2,52
EGP 3,6%	16,67 $\pm$ 0,58	19,33 $\pm$ 2,31

Rezende et al. (2006), avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis a 11% p/v de extrato seco. O resultado obtido pelo método da difusão em agar empregando-se o disco foi de 14 mm para o *Micrococcus luteus* ATCC 9341, enquanto em nosso trabalho encontramos o resultado de 22,33 mm, para a mesma cepa de microrganismo, sendo que a única diferença aparente no método foi a inclusão do microrganismo na superfície, enquanto no método utilizado nesse trabalho utilizamos a técnica de “pour-plate”. Para o *Staphylococcus aureus*, encontramos o halo de inibição de 24,67 mm enquanto Rezende et al. (2006), apresentaram o resultado de 15 mm, para a mesma cepa. Outro fator que pode estar alterando ou modificando o resultado pode estar relacionado com a aplicação das amostras no disco de papel de filtro, já que não fica claro no trabalho de Rezende et al. (2006) a forma de aplicação, enquanto, no

protocolo empregado, realizou-se a aplicação direta da amostra no papel de filtro por embebição, sem prévia diluição das amostras.

Kujumgiev et al. (1999), também avaliaram a atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *S. aureus*. Os resultados variaram entre 11 e 29 mm, de acordo com a amostra de própolis avaliada. Assim, podemos dizer que a divergência de resultados encontrados pode ocorrer em função da origem da própolis ou dos teores de compostos fenólicos e/ou flavonóides presentes em cada amostra avaliada ou ainda de outros princípios ativos que podem atuar nas atividades biológicas da própolis.

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo patogênico que foi selecionado para este estudo já que 34,2% dos pacientes com septicemia que foram a óbito nas unidades hospitalares estavam infectados com esse microrganismo (GANG et al., 2000). Assim, uma forma farmacêutica que se pretenda empregar em pacientes queimados requer atividade antimicrobiana frente a este patógeno.

b. Microdiluição em Microplaca

A atividade antimicrobiana foi uma das primeiras atividades a serem pesquisadas para o extrato de própolis, e se deu em função das observações de assepsia nas colméias. A partir de então, várias cepas de microrganismos foram testadas.

Tem sido relatada atividade antimicrobiana expressiva do extrato de própolis contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e, especificamente, contra bactérias colonizadoras do biofilme na cavidade oral (ALMEIDA et al., 2006; PARK et al., 1998; BARIZON et al., 1999; STEINBERG et al., 1996).

Além das bactérias aeróbicas o efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis foi testado contra um total de 267 cepas anaeróbicas. As culturas de bactéria, de forma geral, mostraram sensibilidade maior para 1 mg/mL de extrato etanólico (KEDZIA, 1988).

No presente estudo foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do gel contendo extrato padronizado de própolis EPP-AF a 3,6% p/v (GEP), nas concentrações finais de 2,5 μ g; 5,0 μ g; 10,0 μ g e 20,0 μ g de gel / orifício da microplaca, conforme protocolos detalhados nos Quadros 01 e 02 (material e métodos).

Na Figura 05 e na Tabela 03, podemos observar que os controles positivos (as cepas dos microrganismos) e os controles negativos (caldo enriquecimento isolado, caldo de enriquecimento na presença do microrganismo e do antibiótico cloranfenicol), responderam conforme esperado, ou seja, nos casos onde se esperava o crescimento microbiano, houve crescimento conforme demonstrado através da coloração azul obtida com o reagente empregado (presença de célula viável). Nos controles negativos, os resultados demonstraram ausência de coloração azul, demonstrando a ausência de células viáveis, assim onde se encontra apenas o meio de cultura há esterilidade e onde se adicionaram as

cepas na presença de antibiótico, este foi capaz de exercer sua atividade. Percebemos então, que a metodologia utilizada foi adequada para a realização dos estudos propostos.

Os orifícios contendo concentrações de gel, correspondentes a 20 µg; 10 µg; 5 µg e 2,5 µg, para o microrganismo *S. aureus*, demonstraram ausência de células viáveis para as concentrações mais altas, porém, houve coloração em azul com a concentração de 2,5 µg de gel/orifício. Assim, concluímos que a CIM para os géis contendo EPP-AF 3,6% corresponde a 5 µg / orifício, ou seja, 50 µg/mL de própolis, concentração onde não houve detecção de células viáveis (Figura 05 e Tabela 03)

Com relação aos experimentos realizados com o *Micrococcus luteus*, não observou-se a resposta esperada para os controles positivo e negativo. Assim, é possível que o método para esse microrganismo não está sendo reprodutível, desta forma, os mesmos não serão considerados neste estudo. É provável que o crescimento não foi detectado no período proposto para a leitura com o revelador químico em função das cepas de *Micrococcus luteus* necessitarem de um tempo de incubação maior para o seu crescimento e conseqüente detecção. Em função do exposto, os dados relativos a este microrganismo não serão analisados.

FIGURA 05 – Fotografia da microplaca apresentando os resultados da atividade antimicrobiana realizada por microdiluição, utilizando o microrganismo gram positivo *Staphylococcus aureus*, *M. luteus* o revelador químico cloreto de trifeniltetrazólio. **(A)** 20 μL do microrganismo e 20 μL do produto em análise. Da esquerda para a direita temos: salina e cepa do microrganismo *S. aureus*; GEP na diluição (1:2); GEP na diluição (1:4); GEP na diluição (1:8); cepa do microrganismo *S. aureus*; meio de cultura; cloranfenicol a 1% em álcool (20 μL); **(C)** 20 μL do microrganismo e 40 μL do produto em análise. Da esquerda para a direita temos: salina e cepa do microrganismo; GEP na diluição (1:2); GEP na diluição (1:4); GEP na diluição (1:8); cepa do microrganismo; meio de cultura; cloranfenicol a 1% em álcool (20 μL); Para as identificações **(E)** e **(G)**, utilizou-se o microrganismo gram positivo *Micrococcus luteus* ATCC 9341, e repetiu-se o protocolo de (A) para (E) e de (C) para (G).

TABELA 03 – Leitura das microplacas, para os microrganismos *M. luteus* e *S. aureus*. Os sinais (+) indicam que houve crescimento de microrganismo, e os sinais (-) indicam que não houve crescimento microbiano. A identificação em coloração verde indica as amostras dos géis nas três diluições (1:2; 1:4 e 1:8).

Colunas	1	2	3	4	5	6	7
Linhas							
A (<i>S. aureus</i> 20 μ L)	+	-	-	+	+	-	-
C (<i>S. aureus</i> 40 μ L)	+	-	-	-	+	-	-
E (<i>M. luteus</i> 20 μ L)	-	-	-	-	-	-	-
G (<i>M. luteus</i> 40 μ L)	-	-	-	-	-	-	-

Na Figura 06 e na Tabela 04, apresentamos os dados da concentração inibitória mínima (CIM) do gel contendo extrato padronizado de própolis EPP-AF a 3,6% p/v, nas concentrações finais de 2,5 μ g; 5,0 μ g; 10,0 μ g e 20,0 μ g de gel / orifício da microplaca, frente ao microrganismo *S. aureus*, na ausência e na presença do inativador do sistema conservante utilizado nos géis, já que a atividade antimicrobiana também poderia estar relacionada ao conservante utilizado no produto, no caso, sorbato de potássio. Também nesse experimento os resultados obtidos com os controles revelam que o método é reprodutível e confiável, e que os meios de cultura utilizados estão estéreis como esperado.

Os resultados apresentados nesta microplaca mostraram que os orifícios corados em azul correspondem à concentração de 2,5 μ g de gel / orifício. Assim, podemos assumir que a CIM para os géis contendo EPP-AF 3,6% é de 5 μ g / orifício, concentração onde não houve detecção de células viáveis, resultados corroborados pela microplaca anterior Figura 05.

Os orifícios contendo o sistema conservante, suas diluições e a utilização do sistema inibidor revelaram a presença de células viáveis, demonstrando que o sistema conservante utilizado não foi o responsável pela atividade antimicrobiana detectada no produto. Também nessa microplaca verificou-se que os orifícios correspondentes ao microrganismo *M. luteus* não apresentaram as respostas esperadas para os controles do experimento, assim, serão desconsiderados, como ocorreu no protocolo realizado na Figura 05.

FIGURA 06 – Fotografia da microplaca apresentando os resultados da atividade antimicrobiana realizada por microdiluição, utilizando *Staphylococcus aureus*, *M. luteus* e o revelador cloreto de trifeniltetrazólio, incluindo-se o estudo de inativação do sistema conservante **(A)** 20 μL do microrganismo e 20 μL do produto em análise. Da esquerda para a direita temos: salina e cepa do microrganismo *S. aureus*; GEP na diluição (1:2); GEP na diluição (1:4); GEP na diluição (1:8); cepa do microrganismo *S. aureus*; meio de cultura; cloranfenicol a 1% em álcool (20 μL); **(B)** GEP (1:2) no inibidor do conservante; GEP (1:4) no inibidor; GEP (1:8) no inibidor; solução sorbato de potássio (SSK) 0,1%; SSK (1:2); SSK (1:4); SSK (1:8); SSK (1:2) no inibidor; SSK (1:4) no inibidor; SSK (1:8) no inibidor; **(C)** 20 μL do microrganismo e 40 μL do produto em análise. Da esquerda para a direita temos: salina e cepa do microrganismo; GEP (1:2); GEP (1:4); GEP (1:8); cepa do microrganismo; meio de cultura; cloranfenicol a 1% em álcool (20 μL); **(D)** GEP (1:2) no inibidor do conservante; GEP (1:4) no inibidor; GEP (1:8) no inibidor; solução sorbato de potássio (SSK) 0,1%; SSK (1:2); SSK (1:4); SSK (1:8); SSK (1:2) diluído no inibidor; SSK (1:4) diluído no inibidor; SSK (1:8) diluído no inibidor. Para as identificações **(E)**, **(F)**, **(G)** e **(H)**, utilizou-se *Micrococcus luteus* ATCC 9341, e repetiu-se o protocolo de **(A)** para **(E)**, de **(B)** para **(F)**, de **(C)** para **(G)** e de **(D)** para **(H)**.

TABELA 04 – Leitura das microplacas. Os sinais (+), indicam que houve crescimento de microrganismo, e os sinais (-) indicam que não houve crescimento microbiano. A identificação em coloração verde indica as amostras dos géis nas três diluições (1:2; 1:4 e 1:8).

Colunas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Linhas										
A (<i>S. aureus</i> - 20 μL)	+	-	-	+	+	-	-			
B (<i>S. aureus</i> - 20 μL)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C (<i>S. aureus</i> - 40 μL)	+	-	-	-	+	-	-			
D (<i>S. aureus</i> - 40 μL)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
E (<i>M. luteus</i> - 20 μL)	-	-	-	-	-	-	-			
F (<i>M. luteus</i> - 20 μL)	-	-	-	-	-	-		+		
G (<i>M. luteus</i> - 40 μL)	-	-	-	-	+	-	-			
H (<i>M. luteus</i> 40 μL)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

Na Figura 07 e na Tabela 05, estão apresentados os resultados encontrados para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que os controles, negativo e positivo, apresentaram os resultados esperados, confirmando a funcionalidade do método para este microrganismo.

A CIM para *Pseudomonas aeruginosa* pode ser considerada como 20 μg do gel / orifício, ou seja, 200 $\mu\text{g/mL}$, já que nas figuras observamos que os orifícios que não se coraram apresentam 20 μg de gel/orifício (coluna 2, linhas A e E).

FIGURA 07 – Fotografia da microplaca apresentando os resultados da atividade antimicrobiana realizada por microdiluição, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* e o revelador cloreto de trifeniltetrazólio, na presença e ausência da inativação do sistema conservante **(A)** 20 μL do microrganismo e 20 μL do produto em análise. Da esquerda para a direita temos: salina e cepa do microrganismo; GEP na diluição (1:2); GEP (1:4); GEP (1:8); cepa do microrganismo; meio de cultura; cloranfenicol a 1% em álcool (20 μL); **(C)** GEP (1:2) no inibidor do conservante; GEP (1:4) no inibidor do conservante; GEP (1:8) no inibidor do conservante; solução sorbato de potássio (SSK) 0,1%; SSK (1:2); SSK (1:4); SSK (1:8); SSK (1:2) no inibidor; SSK (1:4) no inibidor; SSK (1:8) no inibidor; **(E)** 20 μL do microrganismo e 40 μL do produto em análise, repetiu-se o protocolo efetuado em (A). **(G)** 20 μL do microrganismo e 40 μL do produto em análise, repetiu-se o protocolo efetuado em (C).

TABELA 05 – Leitura das microplacas, para a *Pseudomonas*. Os sinais (+), indicam que houve crescimento de microrganismo, e os sinais (-) indicam que não houve crescimento microbiano. A identificação em coloração verde indica as amostras dos géis nas três diluições (1:2; 1:4 e 1:8).

Colunas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Linhas										
A (<i>Pseudom.</i> /20 μ L)	+	-	$\pm$	+	+	+	-			
C (<i>Pseudom.</i> /20 μ L)	-	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+
E (<i>Pseudom.</i> /40 μ L)	+	-	$\pm$	+	+	+	-			
G (<i>Pseudom.</i> /40 μ L)	-	$\pm$	+	+	+	+	+	+	+	+

Os resultados encontrados para a CIM do gel contendo EPP-AF 3,6% foi inferior ao encontrado por Oksus et al. (2005). Os autores encontraram um valor de CIM correspondente a 1,024 μ g/mL para *S. aureus*, mostrando que não são necessárias altas concentrações de gel para a atividade antimicrobiana desejada para este microrganismo. Os resultados são motivadores também em relação à segurança do produto, já que Sonmez et al. (2005), demonstraram as concentrações de extrato de própolis ativas frente a alguns microrganismos, e também as concentrações que apresentavam citotoxicidade aos fibroblastos gengivais. Demonstrou-se que para o extrato glicólico de própolis, a concentração de 2,34 mg/mL foi considerada citotóxica, e para os extratos alcoólicos de própolis a concentração citotóxica para os fibroblastos gengivais foi de 0,586 mg/mL. Dessa forma, a CIM de 50 μ g/mL para *S. aureus* e 200 μ g/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, é segura de acordo com a análise apresentada para fibroblastos gengivais (SONMEZ et al. 2005), ou seja, conseguiu-se chegar ao objetivo

proposto para o produto sem atingir doses capazes de afetarem a integridade celular dos fibroblastos.

Alguns pesquisadores acreditam que a atividade antimicrobiana do extrato de própolis é devida aos flavonóides, aos ácidos aromáticos e aos ésteres presentes na resina. Dimove et al. (1992), apontaram a galangina, pinocembrina e pinostrobin, como os flavonóides reconhecidos como os agentes mais efetivos contra as bactérias.

Kedzia et al. (1988), publicaram que o mecanismo de ação para a atividade antimicrobiana é complexo e que pode ser atribuído ao sinergismo dos flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos.

Foi também demonstrado que a própolis exibiu efeito antimicrobiano pela inibição da divisão celular, desorganização da membrana citoplasmática na parede celular e inibição da síntese protéica (TAKAISI-KIKUNI; SCHILCHER, 1994). Porém, outros estudos são necessários para a confirmação de todos os mecanismos envolvidos.

5.3 Avaliação “in vivo” da Atividade Cicatrizante

A inflamação pode ser dividida em: aguda, crônica e inflamação relacionada a imunidade. Qualquer fator que induza a um dano tissular poderia ser descrito como a patogênese da inflamação. Há dois tipos de fatores de inflamação induzida: o fator de estimulação inflamatória, que inclui: os estímulos físicos, como as queimaduras e cirurgias; químicos, como ácidos, álcalis, alérgenos, etc. e os bioquímicos (microrganismos, parasitas, endotoxinas, toxinas). Outro meio inflamatório inclui histamina, bradicinina, prostaglandina, fator de agregação plaquetária, fatores de pré-estimulação inflamatória (TNF- α , IL-1, IL-6, fator de quimiotaxia celular, etc.), dentre outros (AKARASEREENONT et al., 1995).

A cicatrização de ferimentos ocorre através de uma série de eventos coordenados e mediados por citocinas que requerem a ação em concerto de muitos tipos celulares. A primeira fase da cicatrização é governada primariamente por várias células inflamatórias que se acumulam dentro do ferimento. As plaquetas estão entre os primeiros mediadores inflamatórios a chegar ao sítio da lesão, enquanto os neutrófilos e macrófagos chegam até os dois primeiros dias após o ferimento ter ocorrido e, tipicamente, precedem o influxo de fibroblastos, linfócitos e células endoteliais. A série de eventos bem orquestrada com que esses tipos celulares interagem inclui a liberação de citocinas, de fator de crescimento e de outras moléculas bioativas como os radicais livres (SHUKLA et al., 1997) que, quando bem sucedidas, culminam com a restauração funcional e integridade tissular.

Nos experimentos propostos, obtiveram-se os cortes histológicos das lesões dos animais tratados com soro fisiológico (controle), gel sem própolis, gel contendo 1,2%, 2,4 e 3,6% de extrato seco de própolis, com 3 dias de tratamento, ou seja, no final da série de aplicação produto proposto.

A Figura 8 demonstra o aspecto histológico observado, sendo a Figura 9 A, correspondente ao soro fisiológico e as Figuras 9 B e C, correspondentes ao tratamento com gel sem própolis. O corte histológico apresenta a manifestação do início do processo cicatricial, onde se percebe ainda a presença intensa de células de defesa e especialmente a nata leucocitária (indicada pelas setas nas fotografias).

Quando se utiliza o gel contendo 1,2% de extrato seco de própolis, percebe-se um processo cicatricial mais desenvolvido, pois é possível verificar a presença de um grande número de vasos neoformados, fibroblastos jovens e a presença de plasmócitos, conforme Fotografia apresentada na Figura 9 (A e B). Nesse tratamento já é possível observar que as células epiteliais estão se organizando logo abaixo do coágulo inicial da lesão, conforme seta indicativa na Figura 9 A. A presença das fibras colágenas, que pode ser melhor observada no aumento de 400x na Figura 9 B.

Figura 8 - Fotografia apresentando o processo cicatricial do grupo controle (figura 9 A) e do grupo empregando gel sem própolis (B e C) com 3 dias de tratamento.

Processo cicatricial com 3 dias.

- a) Lesões tratadas com soro fisiológico (controle). Início do processo cicatricial. Cortes 6 μ m corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 100x
- b) Lesões tratadas com gel sem própolis. Início do processo cicatricial. Cortes 6 μ m corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 100x.
- c) Lesões tratadas com gel sem própolis. Observa-se, logo abaixo do coágulo inicial (*) a nata leucocitária (→) . Cortes 6 μ m corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 400x.

Figura 9: Fotografia apresentando o tratamento com gel a 1,2% de extrato seco de própolis. Processo cicatricial com 3 dias de tratamento.

- a) Lesões tratadas com gel contendo extrato padronizado de Própolis 1,2% na região subcutânea (2). Observa-se logo abaixo do coágulo inicial (*) a reorganização das células epiteliais (c) e aumento de fibras colágenas. Cortes 6 μ m corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 100x.
- b) Lesões tratadas com gel contendo extrato padronizado de Própolis 1,2%. Observa-se um grande número de fibroblastos sintetizando fibras colágenas ($\rightarrow$). Cortes 6 μ m corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 400x.

O tratamento com gel a 1,2% de extrato seco de própolis resultou a presença de um grande número de fibroblastos, que não eram observados nos cortes dos tratamentos com soro fisiológico e gel sem própolis. Assim, percebe-se que a presença de própolis, mesmo em menor concentração, foi capaz de desencadear o processo antiinflamatório e cicatrizante, conforme relatado por Paulino et al. (2006).

O efeito antiinflamatório da própolis tem sido atribuído a numerosos mecanismos, como a inibição da produção de eicosanóides ou de óxido nítrico, ação antioxidante, modulação da mobilização do íon cálcio, angiogênese e atividade anti-leucocitária (NAITO et al., 2007). Nos resultados apresentados observa-se que nos cortes histológicos empregando-se tratamento de gel com própolis percebeu-se diminuição de leucócitos, presença de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e fibroblastos, corroborando alguns mecanismos propostos (NAITO et al., 2007), onde foi demonstrado que a própolis modulou a atividade leucocitária, pois o ácido caféico fenetil éster induziu a apoptose dos leucócitos e diminuiu a migração de neutrófilos no sítio inflamatório dos ratos.

Osuagwu et al. (2004), avaliaram a atividade cicatrizante do mel em ferimentos. Os curativos com mel aumentaram a porcentagem de fechamento da ferida no décimo dia em 79,20%. Os valores para o controle foram de 53,50%. Os resultados histológicos não mostraram diferença estatística significativa na quantidade de fibroblastos, mas demonstraram aumento médio de vasos sanguíneos e a formação de tecido de granulação. Assim, é possível que o mel e a própolis atuem por mecanismos distintos no processo de cicatrização, estando à

presença de fibroblastos intimamente relacionada com a maior eficácia do processo de reparo.

Quando se utiliza o gel contendo 2,4% de extrato seco de própolis percebe-se que o processo cicatricial está mais adiantado do que quando se utiliza o gel a 1,2%. A Figura 10 A mostra o fechamento da lesão, onde se percebe na região epitelial as células mais organizadas. Na seta apresentada na figura 10 A pode-se observar a presença de fibras colágenas. A Figura 10 B, que corresponde à região subcutânea, mostra o tecido conjuntivo com a presença de fibroblastos e colágeno e, ainda, um grande número de células em mitose (conforme indicação das setas), o que demonstra o estímulo para a proliferação celular e reparo tissular.

Figura 10: Fotografia apresentando processo cicatricial com 3 dias de tratamento, com gel a 2,4 e 3,6% de extrato seco de própolis.

- A)** Lesões tratadas com gel de própolis a 2,4%. Fechamento da lesão na região epitelial (1) e na região subcutânea (2) observa-se um grande número de fibroblastos sintetizando fibras colágenas (→). Cortes 6 µm corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 100x.
- B)** Lesões tratadas com gel de própolis a 2,4%. Na região subcutânea (2) observa-se aumento de fibras colágenas e um grande número de células em mitose (→). Cortes 6 µm corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 400x.
- C)** Lesões tratadas com gel de própolis a 3,6%. Área do ferimento totalmente reconstruída, o epitélio (1) já se apresenta em várias camadas formando a região córnea. Na região subcutânea (2) observa-se fibras colágenas (→) mais espessas. Cortes 6 µm corados com Tricrômico de Masson. Aumento de 400x.

A Figura 10 C, corresponde ao tratamento realizado com gel contendo 3,6% de extrato seco de própolis, apresenta o tecido completamente reconstituído, onde a camada córnea está toda formada, constituída pelo tecido epitelial adequadamente organizado (1). A região subcutânea apresenta-se densa, bem estruturada e com colágeno, sendo que a matriz extracelular não excede o desejado, como observado na Figura 11, já que a lesão total apresenta profundidade de 2 μm e o tecido formado atingiu quase 1600 nm. É importante observar que a quantidade de colágeno formada no tecido apresentado é satisfatória considerando o efeito desejado, ou seja, regeneração tissular da lesão induzida. Quantidades maiores do que a necessária para a formação do tecido podem originar escaras hipertróficas e quelóides, formadas pela excessiva deposição de matriz extracelular, principalmente colágeno em excesso, além de outras substâncias, como glicoproteínas, glicosaminoglicanas e proteoglicanas (AMADEU et al., 2004). Sabe-se também que, outros fatores como a idade, o sexo do paciente, a raça, a idade da escara, a região corporal afetada e o tipo de lesão podem interferir com a aparência histológica da escara.

Os cortes histológicos dos tratamentos com aplicação única das amostras ou com reaplicação de 12 em 12 horas foram muito semelhantes e apresentaram as mesmas características histológicas. Assim, as fotos correspondentes a todos os tratamentos realizados no trabalho não serão apresentadas. Histologicamente não houve diferença entre o tratamento com aplicação única do produto ou com reaplicações.

As lesões cirúrgicas realizadas nos animais submetidos aos protocolos

experimentais sofrem um processo de cicatrização que termina com o fechamento da lesão, a estruturação do tecido subcutâneo e das fibras colágenas que fornecem sustentação ao tecido e a organização completa da camada epitelial, processo que envolve aproximadamente sete dias.

O aumento da atividade cicatrizante tem sido atribuído ao aumento de formação de colágeno e angiogênese. Os antioxidantes têm demonstrado exercer um papel significativo no processo cicatricial e anti-inflamatório (VOLPERT; ELSTNER, 1996), demonstrando que preparações capazes de aumentar os radicais livres *in situ* favorecem o processo de reparo tissular (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997). Essa informação também foi demonstrada em estudos com asiaticosídeos, obtidos a partir da *Centella asiática*, com reconhecida ação cicatrizante, onde se constatou o aumento de antioxidantes nos novos tecidos formados após a aplicação tópica do princípio ativo, dados que sugeriram que o aumento dos antioxidantes em áreas lesadas pode constituir um fator importante no processo cicatricial (SHUKLA; RASIK; DHAWAN, 1990).

Muito se questiona a respeito da manutenção das atividades biológicas de determinados produtos veiculados em preparações tópicas. Entretanto, no caso do extrato de própolis, Marquele et al. (2005), demonstraram que a atividade antioxidante observada para o extrato, alcoólico ou glicólico, é mantida em preparações tópicas contendo própolis.

Estudos na área odontológica abordam constantemente a propriedade antiinflamatória e também a de regeneração tissular (MAGRO-FILHO;

CARVALHO, 1994). Sabir et al. (2005) mostraram que a atividade da própolis está associada a presença de flavonóides no extrato, pois a utilização do mesmo na ausência dos flavonóides (através de um processo extrativo diferenciado), não resultou no efeito previamente observado.

Os flavonóides apresentam atividade inibitória da cicloxigenase (COX) e da lipooxigenase, redução de prostaglandina E_2 (PGE_2) e expressão da isoforma induzida da COX (COX-2). O ácido caféico fenetil éster (CAPE), um dos flavonóides encontrados principalmente na própolis européia, mostrou atividade antiinflamatória pela inibição da liberação de ácido araquidônico da membrana das células, supressão da atividade enzimática da COX-1 e COX-2 e inibição da expressão gênica da ativação da COX-2 (BORRELLI et al., 2002).

Hu et al. (2005) demonstraram efeito antiinflamatório do extrato etanólico e aquoso de própolis em modelos experimentais envolvendo edema e pleurisia induzidos por carragenina, e também em dano pulmonar agudo. Nos modelos empregados, a reação inflamatória pode ser acelerada pelo óxido nítrico (NO), já que este dilata os vasos sanguíneos que causam o edema e favorecem a chegada de mediadores estimulados pelo aumento de prostaglandina-2 (PGE_2). No estudo, os autores demonstraram que tanto o extrato alcoólico quanto o aquoso inibiram o aumento de PGE_2 e apresentaram um efeito inibitório significativo do NO na exsudação da pleurisia induzida por carragenina.

A relação da própolis ou alguns dos seus constituintes (como os flavonóides, como a quercetina, ácido caféico fenetil éster, galangina, dentre

outros) com o óxido nítrico (NO) é variável, pois alguns trabalhos atribuíram atividade estimulante da produção de NO enquanto outros a inibição do mesmo. Orsi et al. (2000), concluíram que a própolis induziu discreta elevação da liberação de peróxido de hidrogênio e uma inibição da geração de NO, dependendo da concentração. Assim os autores sugeriram que a própolis exerce um importante papel na ativação do sistema imunológico do hospedeiro pela ativação de macrófagos, em protocolo de ingestão oral de própolis. Dessa forma, não podemos esquecer que as várias hipóteses levantadas sobre o mecanismo de ação envolvido no processo antiinflamatório e cicatrizante tópicos podem estar relacionados a concentração de própolis ou de algumas substâncias presentes na mesma.

Os resultados histológicos apresentados mostraram que com apenas uma aplicação dos géis contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF) obtém-se um tecido neoformado organizado e com as funções fisiológicas mantidas (Figura 10). Também pôde ser observado que histologicamente o efeito cicatricial produzido foi praticamente o mesmo entre as concentrações de 2,4% e 3,6%. A repetição das aplicações mostrou-se mais efetiva especialmente quando se observa a análise morfométrica da área cicatrizada (Figura 11), onde se constata que a área de tecido neoformado foi significativamente maior do que na aplicação única quando se utilizou o gel contendo 1,2% de extrato seco de própolis. Para os demais grupos, não houve diferença.

Figura 11 – Representação gráfica do tecido de preenchimento da lesão após 3 dias de tratamento com as amostras testadas, no protocolo de aplicação única e 2 aplicações ao dia (conforme apresentado na Figura 03) – Profundidade da lesão 2 μ m.

Através da análise histológica verifica-se que com o aumento da concentração de própolis, um número maior de células em mitose foi observado, sugerindo um papel estimulador de crescimento fibroblástico por este produto. Nesta análise também ficou bem demonstrado o papel cicatrizante do gel contendo extrato padronizado de própolis, já que para se observar a mesma reconstrução histológica do grupo controle, foram necessários sete dias de acompanhamento.

5.4 Avaliação do potencial genotóxico do produto

Devido às diversas atividades biológicas da própolis e seu uso em alimentos, bebidas e na medicina popular, há um grande interesse no conhecimento da composição química e no entendimento dos mecanismos relacionados à sua ação terapêutica. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou o potencial genotóxico de géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura. Os resultados mostraram que estes géis não aumentaram a frequência de PCEMNs em sangue periférico de ratos que receberam tratamento agudo, subagudo e crônico.

Os resultados obtidos da análise da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) de sangue periférico de animais submetidos ao tratamento agudo, subagudo e crônico com gel contendo diferentes concentrações de própolis estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8, respectivamente. Os dados mostram que há uma pequena variabilidade na frequência de PCEMNs interindividual em cada um dos grupos de tratamento nos três tempos de exposição. Além disso, os animais tratados com géis contendo diferentes concentrações de própolis não apresentaram aumento na frequência de PCEMNs quando comparados àqueles do controle negativo ou tratados com gel sem própolis, considerando o tratamento agudo, subagudo e crônico (Figura 12).

Tabela 06 - Somatória das frequências de PCEMNs obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento agudo com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles. Cada grupo de tratamento possui 5 animais e foram analisadas 2000 PCEs/animal.

Tratamentos	Número de PCEs		PCEMNS		Relação PCE/NCE
	Analisados	Nº	%		
Controle	10000	24	0,24		0,22
Sem própolis	10000	32	0,32		0,27
Própolis 1,2%	10000	6	0,06		0,25
Própolis 2,4%	10000	28	0,28		0,20
Própolis 3,6%	10000	28	0,28		0,25
(#) CPA	10000	89	0,89		0,16

(#) CPA, ciclofosfamida, 50 mg/kg p.c.

O grupo de animais tratados com gel 1,2% de própolis no tratamento agudo apresentou uma frequência menor de PCEMNs em relação aos animais dos demais grupos. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (método de Turkey com o nível de significância igual a $\alpha=0,05$) (Tabela 9).

No tratamento subagudo os valores obtidos entre os grupos de tratamento com géis contendo própolis não apresentaram diferenças significativas, quando comparados aos valores do grupo controle negativo (Tabela 7 e 9).

Tabela 07 - Somatória das frequências de PCEMNs obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento subagudo com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles. Cada grupo de tratamento possui 5 animais e foram analisadas 2000 PCEs/animal.

Tratamentos	Número de PCEs analisados	PCEMNS		Relação PCE/NCE
		Nº	%	
Controle	10000	9	0,09	0,17
Sem própolis	10000	8	0,08	0,16
Própolis 1,2%	10000	9	0,09	0,20
Própolis 2,4%	10000	15	0,15	0,20
Própolis 3,6%	10000	15	0,15	0,15
(#) CPA	10000	89	0,89	0,16

(#) CPA, ciclofosfamida, 50 mg/kg p.c.

A análise do índice de divisão nuclear (IDN) obtida para os tratamentos agudos, subagudos e crônicos não mostraram diferenças significativas na proporção de eritrócitos policromáticos para o total de eritrócitos entre animais tratados com os géis para queimaduras contendo diferentes concentrações de extrato padronizado de própolis e o controle (Tabela 10).

Tabela 08 - Somatória das freqüências de PCEMNs obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento crônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles. Cada grupo de tratamento possui 5 animais e foram analisadas 2000 PCEs/animal.

Tratamentos	Número de PCEs analisados	PCEMNS		Relação PCE/NCE
		Nº	%	
Controle	10000	10	0,10	0,13
Sem própolis	10000	3	0,03	0,12
Própolis 1,2%	10000	6	0,06	0,15
Própolis 2,4%	10000	5	0,05	0,13
Própolis 3,6%	10000	3	0,03	0,15
(#) CPA	10000	89	0,89	0,16

(#) CPA, ciclofosfamida, 50mg/kg p.c.

Tabela 09 - Valores das médias e desvios-padrão das freqüências de PCEMNs observados nos tratamentos agudo, subagudo e subcrônico para o gel contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura.

Tratamentos	Exposição aguda	Exposição subaguda	Exposição crônica
Controle	4,8 ^a ± 3,9	1,8 ^a ± 1,6	2,0 ^a ± 1,2
Gel sem própolis	6,4 ^a ± 4,4	1,6 ^a ± 0,5	0,6 ^a ± 0,9
Gel 1,2% própolis	1,2 ^a ± 1,3	1,8 ^a ± 2,4	1,2 ^a ± 0,8
Gel 2,4% própolis	5,6 ^a ± 4,1	3,0 ^a ± 2,5	1,0 ^a ± 1,4
Gel 3,6% própolis	3,6 ^a ± 2,9	3,0 ^a ± 4,0	0,6 ^a ± 0,5
(#) CPA	17,4 ^b ± 8,2	17,4 ^b ± 8,2	17,4 ^b ± 8,2

(#) CPA (ciclofosfamida 50mg/Kg pc).

As médias com letras diferentes diferiram estatisticamente entre si (p < 0,05).

Tabela 10 – Porcentagem de PCEMNs e IDN (índice de divisão nuclear) obtidas em sangue periférico de ratos Wistar machos submetidos ao tratamento agudo, subagudo e crônico com géis contendo diferentes concentrações de própolis para queimadura, e seus respectivos controles.

Tratamentos	Agudo		Subagudo		Crônico	
	PCEMNS	IDN	PCEMNS	IDN	PCEMNS	IDN
Controle	0,24	0,18±0,06	0,09	0,14±0,03	0,10	0,12±0,02
Sem própolis	0,32	0,21±0,08	0,08	0,14±0,04	0,03	0,10±0,03
Própolis 1,2%	0,06	0,20±0,05	0,09	0,16±0,03	0,06	0,13±0,02
Própolis 2,4%	0,28	0,16±0,04	0,15	0,17±0,05	0,05	0,12±0,03
Própolis 3,6%	0,28	0,20±0,03	0,15	0,13±0,02	0,03	0,12±0,02
(#) CPA	0,89	0,15±0,03	0,89	0,15±0,03	0,89	0,15±0,03

(#) CPA, ciclofosfamida, 50mg/kg p.c.

FIGURA 12: Frequências de PCEMNs obtidas nos tratamentos agudo, subagudo e crônico.

No tratamento crônico, quando se compara a frequência observada nos animais do controle negativo com os demais resultados, nota-se que os grupos gel sem própolis e gel 3,6% tiveram uma frequência de PCEMNs menor (Tabela 08). Mas, essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) (Tabela 9).

Na comparação das frequências de PCEMNs nos diferentes tempos de exposição, observa-se que há uma redução em todos os grupos de tratamentos com 7 e 30 dias de exposição em relação ao tratamento com 24 horas. Essa diminuição pode estar relacionada à adaptação do animal as suas condições de manutenção.

É importante fazer algumas considerações sobre o sistema-teste utilizado no presente trabalho. O teste de micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos (MACGREGOR et al., 1987; HAYASHI et al., 1994). As características básicas do teste de MN são: o efeito do agente químico é observado em PCEs; o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer MN que ele tenha pode ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; os MNs são facilmente identificáveis (Figura 13) e a sua distribuição é bem definida; e a frequência de MNs induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem (RIBEIRO, 2003).

Figura 13 - Eritrócito policromático micronucleado (A), sem micronúcleo (B) e eritrócito normocromático sem micronúcleo (C).

Segundo Abramsson–Zetterberg et al. (1999) desde que ratos têm sido usados como espécie modelo em estudos toxicológicos convencionais, podem ter uma vantagem se o teste de MN for usado em paralelo como uma indicação de efeito genotóxico nesta espécie. No caso de uma exposição prolongada de ratos, espécie comumente utilizada em testes toxicológicos, seria possível pegar do mesmo animal várias amostras de sangue periférico para o teste de MN. A análise de células micronucleadas em amostras de sangue periférico obtida de vários tempos durante o experimento fornece uma importante informação suplementar sobre o tempo decorrido da indução de MNs. Entretanto, Schligel e MacGregor (1984) têm mostrado que ratos eliminam eritrócitos micronucleados do sangue periférico e que o órgão eficaz neste processo é o baço. Dessa forma, eles concluem que a medula óssea do rato deveria ser usada como uma fonte de eritrócitos para o teste de MN.

A rápida eliminação de PCE de sangue periférico pode diminuir a sensibilidade do teste. Entretanto, a sensibilidade pode ser aumentada pelo uso de PCE mais jovens para a análise de MN. Usando citometria de fluxo, a população de PCE jovens pode ser facilmente identificada. Dessa forma, Abramsson–Zetterberg et al. (1999) consideram eritrócitos de sangue periférico de ratos como um bom material para o teste de MN quando uma metodologia correta é usada.

Resultados promissores foram obtidos por Hayashi et al. (1992) que depois da coloração supravital de PCE jovens com acridina orange podem ser discriminados entre os PCE muito jovens de sangue periférico e aqueles mais velhos. Quando os autores restringiram a análise para PCE muito jovens em sangue periférico de ratos, a indução da frequência de PCEMNs foi mais alta que quando esta frequência foi calculada a partir de todos PCE periféricos.

Apesar destas considerações, as vantagens da utilização de eritrócitos de sangue periférico têm motivado vários estudos. A literatura mostra vários trabalhos realizados utilizando a análise de PCEMNs de sangue periférico de ratos para a avaliação do potencial genotóxico de substâncias químicas (HENDERSON et al., 1993; DASS et al., 1997; VIJAYALAXMI et al., 2001; TROSIC et al., 2002). Com relação à via de administração utilizada no presente trabalho, é importante ressaltar que a análise de PCEMNs é adequada para a avaliação da possível mutagenicidade do gel contendo diferentes concentrações de própolis aplicados dermicamente. Itoh et al. (2002) utilizaram o mesmo sistema-teste para avaliar o agente antimicrobiana quinolona administrado dermicamente em camundongos e os resultados mostraram que o método usado pode ser uma ferramenta útil para

detectar *in vivo* quebras cromossômicas e investigar a carcinogênese fotoquímica de medicamentos.

Assim, o teste de MN de sangue periférico empregado no presente trabalho tem sido utilizado em vários estudos de avaliação de mutagenicidade. Além disso, a frequência aumentada de PCEMNs observada em animais tratados com o conhecido agente clastogênico ciclofosfamida (CPA), mostra que o sistema-teste utilizado poderia revelar um aumento na frequência de PCEMNs em animais tratados com gel contendo diferentes concentrações de própolis, caso este fosse mutagênico.

Segundo Hayashi et al. (2000) pelo menos 4 animais analisados e 2000 células por animal podem ser utilizados para determinar a incidência de eritrócitos imaturos micronucleados. No presente trabalho a amostra possui 5 animais do sexo masculino por grupo de tratamento e foram analisadas 2000 células por animal.

A CPA utilizada como controle positivo no presente estudo, é um agente clastogênico que induz principalmente quebras cromossômicas. Dessa forma, MNs induzidos pela CPA contêm fragmentos de cromossomos acêntricos em uma maior proporção que MNs induzidos por agentes aneugênicos como a vincristina (ABRAMSSON-ZETTERBERGERG et al., 1999).

Os resultados obtidos no presente estudo contribuem para o maior entendimento da ação da própolis no organismo humano, e conseqüentemente, proporcionam sua utilização mais efetiva e segura em aplicações clínicas.

5.5 Avaliação do Tempo de Cicatrização de Área Doadora de Pacientes Queimados

As queimaduras podem ser classificadas quanto à extensão, profundidade e evolução, sendo que a morbidade e mortalidade dependerão da classificação, idade, quadro geral do paciente e presença ou não de infecção (MARCHESAN e FARINA, 2003).

As queimaduras são classificadas de acordo com o grau de destruição celular causada na pele e tecidos subcutâneos. Os termos: superficial, parcial e perda total, são também usados para classificar as queimaduras geralmente chamadas de primeiro, segundo e terceiro graus. As queimaduras superficiais causadas por exposição solar são um exemplo, tendo como característica o eritema associado à dor. O grau de destruição celular limita-se às camadas superficiais da epiderme. A dor é motivada devido à produção local de prostaglandinas, produzindo efeito vasodilatador. Nas queimaduras parciais toda epiderme e alguns elementos da derme são destruídos. Quando a queimadura limita-se à destruição do terço superior da derme é classificada como queimadura parcial superficial. A maior permeabilidade capilar na área resulta em edema intersticial com extravazamento de líquido rico em proteínas, elevando a epiderme destruída e resultando na formação das bolhas, que é característica desse tipo de queimadura (MARCHESAN e FARINA, 2003).

A ruptura espontânea da bolha expõe as terminações nervosas resultando dor intensa no local de queimadura. As queimaduras com essas características,

caso não se infectem, cicatrizam entre 7 e 14 dias, produzindo nenhuma ou mínima deformidade estética (MARCHESAN e FARINA, 2003).

Quando toda a epiderme e a maioria dos elementos da derme são destruídas, as queimaduras são classificadas como parciais profundas. O tecido necrosado é aderido e geralmente não há presença de bolha. A dor pode estar presente, mas com menor intensidade, uma vez que as terminações nervosas foram na sua maioria já destruídas. A cicatrização é mais lenta sendo completada entre 14 e 21 dias. A qualidade do tecido regenerado não apresenta as mesmas características da pele normal. Cicatrizes hipertróficas são freqüentes, apresentando tecido regenerado inelástico com deformidades estéticas consideráveis. A conduta no tratamento é controvertida (MARCHESAN e FARINA, 2003).

Diante da dificuldade clínica em se classificar a queimaduras dos pacientes quando os mesmos são recepcionados na Unidade de Queimados e até em função da não uniformidade das queimaduras, quanto ao tipo e profundidade nos pacientes, optou-se pela avaliação de áreas doadoras de enxertos de pele parcial, uma vez que estas apresentam espessura conhecida e uniforme, são de dimensões conhecidas e pode-se empregar lado-a-lado, o produto controle e o teste, simulando as mesmas condições individuais, inclusive local de aplicação. A retirada dos enxertos de pele parcial simula uma condição de queimadura, uma vez que o organismo precisará recompor a área “cirurgicamente lesada”.

A cicatrização de ferimentos é um processo complicado que requer vários passos, qualquer alteração em qualquer etapa pode atrasar o processo cicatricial. Os fatores que retardam a cicatrização podem ser: locais, como por exemplo, sepsis, irradiação prévia, trauma recorrente, oxigenação deficiente, insuficiência arterial ou linfodema; ou sistêmicos, como hipóxia, desordem de colágeno, diabetes, má nutrição, desordens auto-imunes (como artrite reumatóide, por exemplo), dentre outros. Além disso, algumas drogas como os citotóxicos ou imunossupressores, em particular os esteróides, também são capazes de atrasarem o processo de reparo tissular (RASIK; SHUKLA, 2000). Em função disso, no presente trabalho atenção especial foi dada no processo de seleção dos pacientes que compuseram o estudo, sendo que foram excluídos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência renal crônica, insuficiência hepática, diabéticos, gestantes e lactantes, pacientes hipersensíveis a algum agente medicamentoso e os pacientes que não aceitaram participar da pesquisa.

Dessa forma, foram avaliados no total, 31 casos, distribuídos em três áreas doadoras: couro cabeludo (I), membros superiores (II) e membros inferiores (III). A espessura do tecido retirado variou entre 5 e 10 milésimos de polegada. Assim, os pacientes foram distribuídos conforme Tabela 11.

TABELA 11 – Distribuição dos pacientes por região de área doadora (grupos), espessura de pele retirada e quantidade de produto administrado.

Qde. Prod.	Espessura Grupos	0,005 poleg.	0,006 poleg.	0,007 poleg.	0,0075 poleg.	0,008 poleg.	0,010 poleg.	TOTAL
10 mL	Couro Cabel.	-	3	-	2	1	-	6
	Memb. Sup.	-	2	1	-	3	-	6
	Memb. Inf.	-	-	1	3	6	4	14
-	Subtotal	-	5	2	5	10	4	26
20 mL	Couro Cabel.	1	1	-	-	-	-	2
	Memb. Sup.	-	-	-	-	-	1	1
	Memb. Inf.	-	-	1	-	1	-	2
-	Subtotal	1	1	1	-	1	1	5
-	TOTAL	1	6	3	5	11	5	31

Dos pacientes estudados, 12,9% apresentaram idade inferior a 12 anos, 80,65% foram do sexo masculino e 35,48% indivíduos brancos, conforme apresentado na Tabela 12.

Tabela 12 – Informações sobre a população utilizada no estudo dos medicamentos, furacin e gel termorreversível contendo 3,6% de extrato padronizado de própolis (EPP-AF).

	Controle / Teste (*)	
	Número absoluto	%
Idade		
Até 12 / 12 a 18 / >18 anos	4 / 1 / 26	12,90 / 3,23 / 83,87
Sexo		
Masculino / feminino	25 / 6	80,65 / 19,35
Raça		
Negro / pardo / branco / outros	10 / 9 / 11 / 1	32,26 / 29,03 / 35,48 / 3,23

(*) Uma vez que todos os pacientes receberam o medicamento convencional (furacin) e o medicamento teste (gel termorreversível contendo 3,6% de extrato seco de própolis), a população foi a mesma para os dois grupos avaliados.

O trabalho se iniciou com a utilização de 20,0 mL do gel termorreversível / rayon (cerca de 30 cm) e com as áreas doadoras expostas a partir do momento da cirurgia (n=5). O gel foi aplicado no rayon durante a cirurgia, através de procedimento asséptico. Após a excisão do tecido, a área permaneceu em descanso com gaze estéril para absorção do sangramento ocasionado na lesão. Após a retirada das mesmas, aplicou-se o rayon com a medicação teste e controle, sendo que as mesmas eram identificadas através da numeração do paciente e as letras A e B, que eram usadas de modo aleatório para identificar os produtos usados. Após a aplicação dos medicamentos nas áreas, as mesmas

permaneceram expostas ao ambiente. Durante o acompanhamento dos casos, observou-se que nas áreas doadoras formou-se uma camada oclusiva e rígida pela mistura do produto com exsudatos (sangue e fluidos corporais que são formados na área lesada), que poderia prejudicar o andamento do estudo. Esta camada foi observada nas áreas doadoras que receberam o medicamento controle e o teste. Os resultados obtidos com esse grupo de pacientes (n=5) está apresentado na Tabela 13.

TABELA 13 – Relação dos pacientes, grupos, espessura de pele retirada, e tempo (em dias) para cicatrização nas áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF), com a aplicação de 20 ml de produto.

Qde. Prod.	Grupo	Espessura (milés. polegada)	Tempo Cicatrização (dias)	
			Furacin	Própolis
20 mL	I	5	10	10
	I	6	10	10
	II	10	16	14
	III	8	11	10
	III	7	10	10
	média	7,2	11,4 ± 2,60	10,8 ± 1,79

O tempo de cicatrização médio quando se utiliza 20,0 mL de gel contendo própolis/ rayon, e estando a área doadora não-ocluída com a gaze para queimados, obtivemos $11,4 \pm 2,60$ para a pomada de furacin e $10,8 \pm 1,79$ dias para o gel de própolis. Quando se avalia por áreas doadoras, percebe-se que para o grupo II (membros superiores) foram necessários 16 dias para a cicatrização

com furacin e 14 para a área tratada com própolis. Para os grupos, I e III, obteve-se um número de dias semelhantes para a obtenção da reepitelização. É possível que o tempo tenha sido maior para o grupo II em função da maior espessura dos tecidos obtidos, 10 milésimos de polegada.

Em função da espessa camada de exsudatos observada quando da realização do procedimento cirúrgico, optou-se pelo estudo com redução do medicamento teste para 10,0 mL/rayon e as áreas avaliadas passaram a ser ocluídas, utilizando-se gaze para queimados, por cerca de 24 horas após a cirurgia. Deste modo, o excesso de exsudato pode ser absorvido pela gaze, evitando a formação da camada oclusiva que pode prejudicar a cicatrização. Assim, a área doadora passou a ser exposta após 24 horas de oclusão, conforme também realizado no protocolo clínico de GERDING et al. (1990). Verificou-se que a área passou a ficar mais seca e com menor quantidade de substâncias capazes de propiciar retardo na cicatrização (n=26). Os resultados individuais observados para esse protocolo estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 – Relação dos pacientes, grupos, espessura de pele retirada, e tempo (em dias) para cicatrização nas áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato de própolis (EPP-AF), com a aplicação de 10 ml de produto.

Qde. Prod.	Grupo	Espessura (milés. polegada)	Tempo Cicatrização (dias)	
			Furacin	Própolis
10 mL	I	6	4	4
	I	7,5	11	11
	I	6	12	11
	I	6	6	6
	I	7,5	8	8
	I	8	6	6
	II	8	10	9
	II	7	9	9
	II	6	13	12
	II	6	12	12
	II	8	12	13
	II	8	12	11
	III	7,5	11	11
	III	7,5	11	10
	III	7,5	7	7
	III	7	11	10
	III	8	9	9
	III	8	11	11
	III	10	12	12
	III	10	12	12
	III	8	9	9
	III	8	11	9
	III	8	11	9
	III	8	11	9
	III	10	8	8
	III	10	8	8
TOTAL		MÉDIA	7,75 ± 1,23	9,88 ± 2,30
				9,46 ± 2,18

Os resultados individuais obtidos demonstram que o tempo de cicatrização reduziu, especialmente com relação ao grupo I, couro cabeludo. O tempo variou entre 4 e 11 dias, enquanto com 20mL de produto e área exposta, o tempo se mantinha em torno de 10 dias. Para os membros superiores, os tempos variam entre 9 e 13 dias, também houve uma redução quando comparado ao protocolo anterior, que envolvia de 14 a 16 dias. O mesmo comportamento sendo observado no grupo III, onde a variação esteve entre 7 e 11, e anteriormente era de 10 a 11 dias.

Gerding et al. (1990) em seu estudo clínico compara a atividade reepitelizante de sulfadiazina de prata 1% e a membrana Biobrane[®], uma bicamada, de material de cobertura semi-sintético constituído de uma tela de nylon elástica mecanicamente ligada a uma membrana fina e semi-permeável, coberta com polipeptídios colágenos, que mostrou reduzir a perda de umidade em 90% em animais. Os resultados encontrados mostram que a membrana é capaz de reduzir o tempo de cicatrização quando comparada com a sulfadiazina de prata, sendo o tempo, respectivamente, $10,6 \pm 0,8$ e $15,0 \pm 1,2$ dias. O trabalho abordou as diferentes origens das queimaduras, como escaldamento com água, óleo, contato e outros, sendo que os resultados no tempo de reepitelização obtidos variaram com a origem da queimadura. Todos os indivíduos que participaram do estudo foram alocados aleatoriamente nos grupos, não sendo consideradas na avaliação do tempo de cicatrização, as variações individuais como, idade, raça e sexo. Em nosso estudo a variável origem da queimadura (água, óleo, etc.) é inexistente, uma vez que todas as áreas doadoras são obtidas através do mesmo

procedimento cirúrgico, ainda, a análise do tempo de cicatrização não levou em consideração as variáveis individuais dos pacientes que participaram do estudo, assim como ocorreu na avaliação do tempo realizada no estudo clínico de Gerding et al. (1990).

Com relação ao tempo de cicatrização, podemos ver, conforme Tabela 15, que houve diferença, mas não estatisticamente significativa entre os grupos tratados com pomada de nitrofurazona e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis, sendo que o tempo médio obtido com 20,0 mL do produto foi $11,4 \pm 2,61$ dias para o furacin® e $10,8 \pm 1,79$ para o gel de própolis, enquanto que utilizando-se 10,0 mL do produto, foi $9,88 \pm 2,30$ e $9,46 \pm 2,18$ respectivamente. Houve uma vantagem sutil na redução média do tempo de cicatrização quando reduzimos a quantidade de produto e quando a área é ocluída, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Analisando-se o tempo de reepitelização para o total de pacientes estudados ($n=31$), observamos $10,13 \pm 2,38$ dias para a cicatrização com a pomada de furacin e $9,68 \pm 2,15$ para o gel contendo própolis. Dessa forma, é possível concluir que através da análise dos dados dos tempos de cicatrização para ambos os tratamentos são semelhantes.

TABELA 15 – Distribuição média dos pacientes por grupos (áreas), espessura média de pele retirada, quantidade de produto administrado e tempo médio para cicatrização nas áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF).

Qde. Prod.	Grupo	Espessura (milés. Pol.)	Tempo Cicatrização	
			Furacin	Própolis
20 mL (n=5)	I	5,50 ± 0,71	10,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00
	II	10,00 ± 0,00	16,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00
	III	7,50 ± 0,71	10,50 ± 0,71	10,00 ± 0,00
SUBTOTAL	MÉDIA	7,66 ± 2,25	11,40 ± 2,60	10,80 ± 1,79
10 mL (n=26)	I	6,83 ± 0,93	7,83 ± 3,13	7,66 ± 2,88
	II	7,16 ± 0,98	11,33 ± 1,51	11,00 ± 1,67
	III	8,39 ± 1,09	10,14 ± 1,61	9,57 ± 1,50
SUBTOTAL	MÉDIA	7,75 ± 1,23	9,88 ± 2,30	9,46 ± 2,18
Média/ área doadora (n=31)	I	6,50 ± 1,04	8,38 ± 2,83	8,25 ± 2,66
	II	7,57 ± 1,40	12,00 ± 2,24	11,43 ± 1,90
	III	8,28 ± 1,08	10,19 ± 1,52	9,63 ± 1,41
TOTAL (*)	MÉDIA	7,66 ± 1,34	10,13 ± 2,38	9,68 ± 2,15

(*) média dos resultados utilizando o total de pacientes estudados (31), independente da quantidade de produto aplicado e a oclusão da área (10 mL e 20 mL do produto).

O crescente interesse por medicamentos ou procedimentos capazes de reduzir o tempo de cicatrização, além de fatores como melhor qualidade de vida, maior comodidade do paciente, menores custos hospitalares, envolve também a

formação de escaras hipertróficas. Pois, de acordo com Deitch et al. (1983), um dos mais importantes indicadores da possibilidade de uma complicação no ferimento ocorrer está relacionada ao tempo da ferida, assim, se o tempo de cicatrização de uma queimadura estiver entre 14 e 21 dias, um terço dos sítios anatômicos poderão se tornar hipertróficos; se a queimadura levar mais de 21 dias para cicatrizar, cerca de 78% dos sítios queimados poderão desenvolver escaras hipertróficas.

Percebemos que o tempo de reepitelização diferiu de área para área, conforme discutido previamente e apresentado nas Figuras 14, 15 e 16, sendo o couro cabeludo, a que apresentou menor tempo médio de reepitelização e a que obteve os menores tempos individuais também, justificando o grande uso desta região na clínica, além dessa área apresentar como vantagem não deixar marcas estéticas para os pacientes. Para o grande queimado, quanto mais rápida a remoção de tecido necrótico maiores são as chances de recuperação do paciente, e assim, quanto menor o tempo de cicatrização da área doadora maiores as chances dessa mesma área ser reutilizada para uma nova enxertia. Isso é de suma relevância especialmente nos casos de pacientes que apresentam de 80 a 90% de queimadura e assim disponibilizam pequena área para enxertia.

Figura 14 - Distribuição média dos pacientes por grupos (áreas) e tempo médio para cicatrização das áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF), aplicados na quantidade de 10 mL de produto / rayon utilizado (n=26).

Figura 15 - Distribuição média dos pacientes por grupos (áreas) e tempo médio para cicatrização das áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF), aplicados na quantidade de 20 mL de produto / rayon utilizado (n=5).

Figura 16 - Distribuição média dos pacientes (n=31, independente da quantidade de produto aplicado) por grupos (áreas) e tempo médio para cicatrização das áreas com pomada de furacin e gel termorreversível contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF).

(A)

(B)

(C)

FIGURA 17 – Fotografia de área doadora do grupo I (couro cabeludo), com espessura do enxerto de 6,0 milésimos de polegada e 10,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.
(A) Fotografia no momento da cirurgia.
(B) Fotografia com 2 dias após cirurgia.
(C) Área com 11 dias após a cirurgia.

FIGURA 18 – Fotografia de área doadora do grupo III (membros inferiores), com espessura do enxerto de 8,0 milésimos de polegada e 20,0 mL do produto em uma tira de rayon, área não ocluída nas primeiras 24 horas.

(A) Registro durante a cirurgia.

(B) Fotografia com 10 dias após cirurgia, percebe-se que a área identificada com a letra “A” (própolis) está parcialmente desprendida do tecido, enquanto a área doadora tratada com furacin (B) ainda não começou a se desprender, sinalizando que ainda não está completamente cicatrizado.

(C) Área com 11 dias após a cirurgia. Desprendimento das duas áreas, sendo que a área B (furacin) apresenta sinais de área não completamente cicatrizada (área esquerda).

(A)

(B)

(C)

FIGURA 19 – Fotografia de área doadora do grupo I (couro cabeludo), com espessura do enxerto de 6,0 milésimos de polegada e 10,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.

(A) Após a abertura do curativo com 24 horas após a cirurgia.

(B) Foto com 7 dias após cirurgia, percebe-se que a área identificada com a letra “B” (própolis) está parcialmente desprendida do tecido, enquanto a área doadora tratada com furacin (A) ainda não começou a se desprender significativamente.

(C) Área com 11 dias após a cirurgia. Desprendimento completo da área B (própolis), enquanto a área A (furacin) ainda não se desprendeu completamente.

(A)

(B)

FIGURA 20 – Fotografia de área doadora do grupo III (membros inferiores), com espessura do enxerto com 8,0 milésimos de polegada e 10,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.

(A) Foto 48 horas após a abertura do curativo.

(B) Foto com 13 dias após cirurgia. Desprendimento das duas áreas estudadas.

Apesar da maioria dos casos ter apresentado tempo de reepitelização semelhante nas duas áreas, conforme apresentado na Figura 16, destacamos 3 áreas apresentadas na Figura 21, referente aos membros inferiores e às áreas identificadas no paciente como: **11 A** própolis, **11B** furacin, **12A** furacin, **12B** própolis, **13 A** própolis e **13 B** furacin. Foi possível observar, claramente, que as áreas contendo o gel com própolis foram as áreas a se desprenderem mais rapidamente e de modo espontâneo.

(A)

(B)

(C)

(D)

FIGURA 21 – Fotografia de área doadora do grupo III (membros inferiores), com espessura do enxerto com 8,0 milésimos de polegada e 10,0 mL do produto em uma tira de rayon, área ocluída por 24 horas.

(A) e (B) Registro fotográfico após 48 horas da abertura do curativo. Identificação das áreas: **11A** própolis, **11B** furacin, **12A** furacin, **12B** própolis, **13 A** própolis e **13 B** furacin.

(C) e (D) Foto com 9 dias após cirurgia, percebe-se que as áreas contendo própolis (11A, 12B e 13A) estão sem o rayon, demonstrando que houve reepitelização já no 9º. dia após a cirurgia, enquanto as áreas contendo furacin (11B, 12A e 13B) ainda não se desprenderam, sinalizando que ainda não está cicatrizado.

A utilização do gel contendo extrato de própolis, apesar de não ter apresentado redução do tempo em dias, com diferença estatística, quando se analisam todos os pacientes, independente do sexo, raça, idade e área avaliada, nos deixa com grande satisfação, uma vez que a literatura científica aponta como produto de maior rapidez e efeito completo na reepitelização de áreas doadoras, o produto ALLEVYN® (Canadá), que utiliza em média $9,1 \pm 1,6$ dias, para completa reepitelização (INNES et al., 2001). Ainda, documentamos evidências da reepitelização mais rápida, cerca de 1 dia, da área contendo o extrato de própolis quando comparado ao controle, nos estimulando no desenvolvimento de projetos de estudo clínico.

A utilização de produtos naturais na reepitelização de tecidos, bem como em outras áreas do conhecimento, é ainda restrita e carente de pesquisas clínicas, assim, encontrarmos nesta primeira fase do projeto utilizando o extrato de própolis EPP-AF um resultado semelhante ao medicamento sintético de referência, furacin®, já é para nós um grande sucesso, uma vez que as dosagens escolhidas foram embasadas nos trabalhos realizados em roedores, que não correspondem aos seres humanos.

Em função destes dados e das informações científicas disponíveis para a própolis no processo de cicatrização de feridas e queimaduras, acreditamos que um estudo com uma abrangência maior no número de pacientes poderia oferecer um resultado melhor.

6. Conclusões

Com base nas metodologias selecionadas, conclui-se que:

O extrato de própolis (EPP-AF), alcoólico, glicólico e nas concentrações dos géis apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus*. Os géis nas três concentrações de própolis não se difundiram pelo meio de cultura no sistema de difusão em discos.

A CIM obtida para o gel contendo extrato padronizado de própolis EPP-AF a 3,6% p/v, foi de 50 ug/ml para o microrganismo *Staphylococcus aureus* e 200 ug/mL para *Pseudomonas aeruginosa*;

O gel contendo 3,6% de EPP-AF foi o que apresentou melhor resultado na qualidade do tecido formado, enquanto com relação ao tempo de cicatrização, os mesmos resultados foram obtidos para o produto a 3,6% e a 2,4% de EPP-AF;

Os animais tratados com gel contendo diferentes concentrações de própolis não apresentaram aumento na frequência de PCEMNs quando comparados àqueles do controle negativo ou tratados com gel sem própolis, considerando o tratamento agudo, subagudo e crônico, ou seja, os produtos avaliados não apresentaram potencial genotóxico;

No estudo de eficácia clínica, obtivemos tempo de cicatrização médio de $10,18 \pm 2,48$ dias para a pomada de furacin e $9,75 \pm 2,11$ para o gel contendo própolis.

Com base nos resultados encontrados podemos concluir que o gel contendo extrato padronizado de própolis EPP-AF apresenta potencial para o tratamento de pacientes queimados.

Referências

- ABRAMSSON-ZETTERBERG, L. A.; GRAWÈ, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. **Mechanisms of Mutagenesis**, v. 423, p. 113-124, 1999.
- AKARASEREENONT, P., MITCHELL, J.A., BAKHLE, C., THIEMERMANN, C., VANE, J.R. Comparison of the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in endothelial cells and macrophages. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 273, p. 121-128, 1995.
- ALLGOWER, M., SCHOENEBERGER, G.A., SPARKES, B.G. Burning the largest immune organ. **Burns**, v. 21, suppl. 1, S7-S47, 1995.
- ALMEIDA, R.V.D., CASTRO, R.D., PEREIRA, M.S.V., PAULO, M.Q., SANTOS, J.P., PADILHA, W.W.N. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas, **Pesquisa Brasileira de Odontopedia Clínica Integrada**, João Pessoa, v.6, n.1, p. 87-92, 2006.
- AMADEUS, T.P., BRAUNE, A.S., PORTO, L.C., DESMOULIÈRE, A., COSTA, A.M.A. Fibrillin-1 and elastin are differentially expressed in hypertrophic scars and keloids. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, n. 2, p. 169-174, march-april, 2004.
- ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, suppl. S1, p. 5-16, 2001.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN-JÚNIOR, L.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed., São Paulo, Premier, 1999, p.318.
- AZEVEDO, I. B. S.; SAMPAIO, R.F. Tratamento das escaras de decúbito com própolis. **Revista Brasileira Enfermagem**, Brasília, v. 39, n. 2/3, p. 33-37, abr./set.,1986.
- AZEVEDO, R.V.P.; KOMESU, M.C.; CANDIDO, R.C.; SALVETTI, C.; REZENDE, F.H.C. Cândida sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 335-341, 1999.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, T.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, W. Sussex, v. 15, p. 561-571, 2001.
- BANSKOTA, A.H.; YASUHIRO, T.; ADNYNA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G. E KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China., **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 72, p. 239-246, 2000.

BARIZON, E., OLIVEIRA, P., FIGUEIREDO, E., FIGUEIREDO, L.C., BASTOS, J.K., SALVADOR, S.L. Determinação da atividade antimicrobiana da própolis em solução alcoólica, mel e mel com própolis. **Revista da Universidade de Franca**, edição especial, ano 7, número 7, agosto de 1999, p. 51.

BERRETTA, A. A. **Desenvolvimento e avaliação de uma forma farmacêutica de liberação sustentada contendo extrato padronizado de própolis para o tratamento de queimaduras**. 2003. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto.

BERRY, D.B. AND SULLINS, K.E. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect on the limbs in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n° 1, p. 88-92, 2003.

BORRELLI, F., MAFFIA, P., PINTO, L., IANARO, A., RUSSO, A., CAPASSO, F., IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of própolis extract. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, Suppl. 1, p. S53-S63, 2002.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 36, p. 347-363, 1998.

Cabana, A.; Ait-Kadi, A.; Juhasz, J. Study of the gelation process of polyethylene oxide-polypropylene oxide- polyethylene oxide copolymer (poloxamer 407®) aqueous solution. **J. Colloid. Interf. Sci.**, Orlando, v. 190, p. 307-312, 1997.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, p. s1-s6, 2002. (Suppl.1).

CERESÉR, K. M.M., SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M. Sulfadiazina de prata e outros fármacos utilizados no tratamento de queimados. **RBM – Rev. Bras. Méd.**, Rio de Janeiro, v. 52 (6), p. 637-644, jun, 1995.

CHIEN, Y. **Novel drug delivery systems**. Concepts and system design for rate controlled drug delivery. New York:Marcel Dekker, 1992, p.1-42.

CZYZEWSKA, A.; MZUR, L. Supressing effect of WR-2721 on micronuclei induced by cyclophosphamide in mice. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 15, p. 109-114, 1995.

DASS, S. B. et al. Frequency of spontaneous and induced micronuclei in the peripheral blood of aging mice. **Mutation Research**, v. 381, p. 105-110, 1997.

- DEITCH, E.A., WHEELAHAN, T.M., ROSE, M.P., CLOTHIER, J., COTTER, J. Hypertrophic burn scars: analysis of variables. **The Journal of Trauma**, v. 23, n. 10, p. 895-898, 1983.
- DEMLING, R.H. Medical progress. **The New England Journal of Medicine**. London, v. 313, n. 22, p. 1389-1398, 1985.
- DÍAZ, J.C.Q.; RODRIGUEZ, O.A.; VELÁZQUEZ, M.D.; MILIÁN, M.L. Empleo de la tintura de propóleo al 5% em la cura de heridas sépticas faciales. **Revista Cubana Estomatología**., Habana, v.34, n. 1, p. 25-27, 1997.
- Edsman, K.; Carlfors, J.; Peterson, R. Rheological evaluation of poloxamer 407® as a in situ gel for ophthalmic use. **Euroofpean Journal Pharmaceutical Science**, Amsterdam., v. 6, p.105-112, 1998.
- EROGLU, E.; AGALAR, F.; ALTUNTAS, I. AND EROGLU, F. Effects of granulocyte-colony stimulationg factor on wound healing in a mouse model of burn trauma., **Tohoku Journal of Experimental Medicine**, 204, p. 11-16, 2004.
- FERNANDES. A. Jr.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A.M. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.1, n. 2, 1995.
- FIGUEIREDO, F., OLIVEIRA, P., BARIZON, E., FIGUEIREDO, L.C., BASTOS, J.K, SALVADOR, S.L., Determinação da diluição inibitória máxima de um enxaguatório bucal a base de própolis e extratos vegetais. **Revista da Universidade de Franca**, edição especial, ano 7, número 7, agosto de 1999, p. 51.
- FITZPATRICK, L.R.; WANG, J.; LE, T. Caffaic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor- κ B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 3, p. 915-920, 2001.
- FREITAS, M.N.; FARAH, M.; BRETAS, R.E.S.; RICCI-JUNIOR, E.; MARCHETTI, J.M. Rheological characterization of poloxamer 407 nimesulide gels. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**., v. 27, n. 1, p. 113-118, 2006.
- FUNARI, C.S., FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, jan-mar, 2006.
- FURTADO, N.A.; SAID, S.; ITO, I.Y.; BASTOS, J.K The antimicrobial activity os *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. **Microbiological Research**, v. 157, n. 3, p. 207-11. 2002.
- GANG, R.K., SANYAL, S.C., BANG, R.L., MOKADDAS, E., LARI, A.R. Staphylococcal septicemia in burns. **Burns**, v. 26, 359-366, 2000.

GEBARA, E.C.E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, 2002.

GERDING, R.L., EMERMAN, C.L., EFFRON, D., LUKENS, T., IMBEMBO, A.L., FRATIANNE, R.B. Outpatient management of partial-thickness burns: biobrane[®] versus 1% silver sulfadiazine. **Annals of Emergency Medicine**, v. 19, n. 2, p. 121-124, 1990.

GOLLAPUDI, B.B.; MacFADDEN, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation Research**, v. 347, p. 97-99, 1995.

GREGORY, S.R.; PICCOLO, N.; PICCOLO, M.T., PICCOLO, M.S. E HEGGERS, J.P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New York, v. 8, n.1, p. 77-83, 2002.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency – commentary. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, New York, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYASHI, M. et al. In vivo redent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 312, p. 293-304, 1994.

HAYASHI, M. et al. In vivo rodent micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 234-252, 2000.

HAYASHI, M. et al. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin c- and cyclophosphamide treated rats. **Mutation Research**, v. 35, p. 209-213, 1992.

HENDERSON, L.; FEDYK, J.; WINDEBANK, S.; SMITH, M. Induction of micronuclei in rat bone marrow and peripheral blood following acute and subchronic administration of azathioprine. **Mutation Research**, v. 29, p. 79-85, 1993.

HEO, M.Y.; SOHN, S.J. E AU, W.W. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate – review. **Mutation Research**, 488, p. 135-150, 2001.

HETZENHOUSER, B.; HANSCH, C.; KAPUR, S. E SELASSIE, D. Mechanism of toxicity of esters of caffeic and dihydrocaffeic acids., **Bioorganisc & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 199-209, 2001.

- HIGUCHI, T. Analysis of rate on the medicament release from ointment. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 51, n. 8, p. 802-4, 1962.
- HIGUCHI, T. Mechanism of sustained action medication. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 52, n. 12, p. 1145-9, 1963.
- HU, R. H et al. A rabbit model for metabolic studies after burn injury. **Journal of surgical research**, v. 75, n. 2, p. 153-158, 1998.
- HU, F., HEPBURN, H.R., LI, Y., CHEN, M., RADLOFF, S.E., DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 100, p. 276-283, 2005.
- INNES, M. E.; UMRAY, N.; FISH, J.S.; GOMEZ, M.; CARTOTTO, R.C. The use of silver coated dressings on donor site wounds: a prospective, controlled matched pair study. **Burns**, v. 27, n. 6, p. 621-627, 2001
- ITOH, S.; KATOH, M.; FURUHAMA K. In vivo photochemical micronucleus induction due to certain quinolone antimicrobial agents in the skin of hairless mice. **Mutation Research**, v. 520, p. 133-139, 2002.
- JENG, S. N. et al. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, p. 893-897, 2000.
- JOHNSTON, T.P.; MILLER, S.C. Toxicological evaluation of poloxamer 407® vehicle for intramuscular use. **J. Parent. Sci. Technol.**, Philadelphia, v. 39, n. 2, Mar/Apr, 1985.
- KEDZIA, A.; KALOWSKI, . Estimation of the effectiveness of ethanol extract of propolis on obligate anaerobes of oral cavity. **Czas Stomatol.**, v. 41, n. 12, p. 757-62, Dec, 1988.
- KIDERMAN, A.; TORTEN, R.; FURST, A.L.; REINUS, K. Bi-lateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 12, n°. 1, p. 29-31, 2001.
- KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by artemisinin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, Attiki, v. 21, p. 221-228, 2001.
- KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitriloacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artemisinin C. **Pathology International**, Victoria, v. 50, p. 679-689, 2000.

- KJOLSETH, D.; FRANK, J.M.; BARKER, J.H.; ANDERSON, G.L.; ROSENTHAL, A.I.; ACLAND, R.D., SCHUSCHKE, D.; CAMPBELL, F.R., TOBIN, G.R. AND WEINER, L.J. Comparison of the effects os commonly used wound agents on epithelialization and neovascularization., **Journal of the American College of Surgeons**, v. 179, n°. 3, p. 305-12, 1994.
- KOO, H., GOMES, B.P.F.A., ROSALEN, P.L., AMBROSANO, G.M.B., PARK, Y.K., CURY, J.A., In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, n. 45, p. 141-148, 2000.
- KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., AMBROSANO, G.M.B., MURATA, R.M., YATSUDA, R., IKEGAKI, M., ALENCAR, S.M., PARK, Y.K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans Streptococci, **Current Microbiology**, vol. 41, p. 192-196, 2000.
- KOO, M. H.; PARK, K. P. Investigação do teor de flavonóides totais da própolis de *Apis mellifera* do Brasil. **Revista Brasileira de Apicultura**, p. 8-11, jul./ago. 1996.
- KRIZKOVÁ, L.; NAGY, M.; POLÓNYI, J. E EBRINGER, L.; The effect of flavonoids on ofloxacin-induced mutagenicity in *Euglena gracilis*. **Mutation Research**, v. 416, p. 85-92, 1998.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. E POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 64, p. 235-240, 1999.
- KUMAZAWA; S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Oxon, v. 84, p.329-339, 2004.
- LAI, E.Y., CHYAU, C.G.; MAU, J.L.; CHEN, C.G.; LAI, Y.J.; SHIH, C.F., LIN, L.L. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the essential oil of *Curcuma zedoaria*. **Am. J. Chin. Med.**, v. 32, n. 2, p.281-90, 2004.
- LI, C. ; PALMER, W.K. ; JOHNSTON, T.P. Disposition of poloxamer 407® in rats following a single intraperitoneal injection assessed using a simplified colorimetric assay. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Amsterdam, v. 14, p. 659-665, 1996.
- MACGREGOR, et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, p. 103-112, 1987.
- MACKAY, D. AND MILLER A.L. Nutritional support for wound healing – Review. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n°. 4, p. 359-377, 2003.
- MADAN, P.L. Sustained release drug delivery systems: Part I, An overview. **Pharm Manuf.**, Surrey, p. 23-7, Feb. 1985.

MAGRO-FILHO, O. ; de CARVALHO, A.C. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 32, p. 4-13, 1990.

MAGRO-FILHO, O., CARVALHO, A.C.P. Topical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. **J. Nihon Univ. Sch. Dent.**, v. 36, n.2, p. 102-111, 1994.

MALPASS, K.G., SNELLING, C.F.T., TRON, V. Comparison of donor-site healing under xeroform and jelonet dressings: unexpected findings. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.112, p. 430-439, 2003.

MARCHESAN, W.G. e FARINA, J.A.JR. In. Capítulo 13: JORGE, S.A. e DANTAS, S.R.P.E., **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. São Paulo:Editora Atheneu, cap. 13, p.163-208, 2003.

MARCUCCI, M. C. Utilização da própolis na indústria cosmética. **Aerosol e Cosméticos**, p. 34-36, 1996.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. Disponível em: [www.roberg.com.br/PaginaTrabalho Cientifico06.htm](http://www.roberg.com.br/PaginaTrabalhoCientifico06.htm)>. Acesso em: 31 jul. 2003.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, p. 105 – 112 , 2001.

MARTINS, R.S.; PEREIRA, E.S.J.; LIMA JR., S.M.; SENNA, M.I.B.; MESQUITA, R.A.; SANTOS, V.R. Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. **Journal of Oral Science**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 41-48, 2002.

MARQUELE, F.D., Di MAMBRO, V.M., GEORGETTI, S.R., CASAGRANDE, R., VALIM, Y.M.L., FONSECA, M.J.V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of própolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 455-462, 2005.

Moore, T.; Croy, S.; Mallapragada, S.; Pandit, N. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic F-127 gel dissolution: drug release in stirred system. **J. Control. Rel.**, Amsterdam, v. 67, p. 191-202, 2000.

NAITO, Y., YASUMURO, M., KONDOU, K., OHARA, N. Antiinflammatory effect of topically applied própolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research**, W. Sussex, v. 21, p.452-456, 2007.

NALBANDIAN, R.M.; HENRY, R.L.; BALKO, K.W.; ADAMS, D.V.; NEUMAN, N.R. Pluronic F-127 gel

preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. **Journal of Biomedical Material Research**, Detroit, v. 21, p.1135-1148, 1987.

NAYAK, S.; NALABOTHU, P.; SANDIFORD, S.; BHOGADI, V. AND ADOGWA, A. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica* L. And *Laurus nobilis* L. Extracts on rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine.**, 6:12, 2006.

OKSUZ, H.; DURAN, N.; TAMER, C., CETIN, M.; SILICI, S. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. **Ophthalmic Research**, v. 37, p. 328-334, 2005.

ORSI, R.O., FUNARI, S.R.C., SOARES, A.M.V.C., CALVI, S.A., OLIVEIRA, S.L., SFORCIN, J.M., BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **J. Venom. Anim. Toxins.**, Botucatu, v. 6, n. 2, 2000.

ORSOLIC, N., BENKOVIC, V., HORVAT-KNEZEVIC, A., KOPJAR, N., KOSALEC, I., BAKMAZ, M., MIHALJEVIC, Z., BENDELJA, K., BASIC, I. Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of propolis and its polyphenolic compounds. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 946-951, 2007.

OSUAGWU, F.C., OLADEJO, O.W., IMOSEMI, I.O.; AIKU, A.; EKPOS, O.E., SALAMI, A.A., OYEDELE, O.O. AND AKANG E.U. Enhanced wound contraction in fresh wounds dressed with honey in wistar rats (*Rattus norvegicus*). **West. Afr. J. Med.**, v. 23, n°. 2, p. 114-8 2004.

OZTURK, F.; KURT, E.; CERCI, M.; EMIROGLU, L. ; INAN, U. ; TURKER, M. AND ILKER, S. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. **Ophthalmic Research**, v. 32, n°. 1, p. 13-8, 2000.

OZTURK, F.; KURT, E.; INAN, U.U.; EMIROGLU, L.; ILKER, S.S., The effects of acetylcholine and propolis extract on corneal epithelial wound healing in rats. **Cornea**, v. 18, n°. 4, p. 466-71, 1999.

PAAVOLA, A; YLIRUUSI, J.; KAJIMOTO, Y.; KALSO, K.; WAHLSTROM, T.; ROSENBERG, P. Controlled release of lidocaine from injectable gels and efficacy in rat sciatic nerve block. **Pharmaceutical Research**, New York, v.12, p.1997-2002, Aug., 1995.

PAMPLONA, B. Própolis, composição e atividades terapêuticas. **Revista Racine**, p. 49-53, mar./abr. 1997.

PANKUCH, G.A.; LIN, G.; HOELLMAN, D.B.; GOOD, C.E., JACOBS, M.R. AND APPELBAUM, P.C. Activity of retapamulin against *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* evaluated by agar dilution, microdilution, E-test, and disk diffusion methodologies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n°. 5, p. 1727-1730, 2006.

PARK Y.K.; IKEGAKI M. preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience Biothechnology Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998.

PARK, Y. K. et al. Chemical constituents in *baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 52, p. 1100-1103, 2004.

PARK, Y.K., KOO, M.H., IKEGAKI, M., CURY, J.A., ROSALEN, P.L. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces maeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 143-148, 1998.

PAULINO, N.; TEIXEIRA, C.; MARTINS, R. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. **Planta Medica**, Basel, v. 72, p.990-906, 2006.

RASIK, A.M., SHUKLA, A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. **International Journal Experimental Pathology**, v. 81, p. 257-263, 2000.

REIS, C.M.F, MENDES, L.S., MAIA JR., L.O.F, KAMP, A.V., BASTOS, J.K., MACEDO, S.B., CARVALHO, J.C.T. Estudo das atividades anti-inflamatória e da toxicidade em fase de tratamento sub-crônico da propomálva. **Revista da Universidade de Franca**, edição especial, ano 7, número 7, agosto de 1999, p. 53.

De REZENDE, G.P. da S.R., PIMENTA, F.C., Da COSTA, L.R.de R.S. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial própolis extracts. **Brazilian Journal of Oral Science**, v. 5, n. 16, 967-970, 2006.

RIBEIRO, L. R. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: MARQUES, E. K.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. (Orgs). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da Ulbra, 2003. cap. 7, p. 173-2003.

RICCI, E.J.; BENTLEY, M.V.L.B.; FARAH, M.; BRETAS, R.E.S., MARCHETTI, J.M. Rheological characterization of poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 17, P. 161-167, 2002.

RICCI, E.J.; LUNARDI, L.O.; NANCLARES, D.M.A.; MARCHETTI, J.M. Sustained release of lidocaine from poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 288, p. 235-244, 2005.

ROSSI, L.A.; FERREIRA, E.; COSTA, E.C.F.B.; BERGAMASCO, E.C.; CAMARGO, C. Prevenção de queimaduras: percepção de pacientes e de seus familiares. **Revista Latino- Americana de Enfermagem**, v. 11(1), p. 36-42, jan-fev. 2003.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of própolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 73, p. S21-S29, 2002. (Suppl. 1).

- SABIR, A., TABBU, C.R., AGUSTIONO, P., SOSROSENO, W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. **Journal of Oral Science**, v. 47, n.3, p. 135-138, 2005.
- SANTOS, F. A. et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytotherapy Research**, W. Sussex, v. 17, p. 285-289, 2003.
- SCHIMID, W. Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells. **Agents and Actions**, v. 3, p. 77-85, 1973.
- SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J. T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized fischer 344 rats: implication for cytogenetic screening. **Mutation Research**, v. 127, p. 169-174, 1984.
- SCHMOLKA, I. V. Artificial skin I. preparation and properties of pluronic f.-127 gels of treatment of burns. **Journal of Biomedical Material Research**, New York, v. 6, p. 571-82, 1972.
- SFORCIN, J.M., FERNANDES JR. A., LOPES, C.A.M., BANKOVA, V., FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 73, p. 243-249, 2000.
- SFORCIN, J.M.; KANENO, R. E FUNARI, S.R.C., Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity., **J. Venom. Anim. Toxins**, Botucatu, v.8, n.1, 2002.
- SFORCIN, J.M.; NOVELLI, E.L.B.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. **J. Venom. Toxins**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 244-254, 2002.
- SILVA, M.G.; FURTADO, N.A.; PUPO, M.T.; FONSECA, M.J.; SAID, S.; DA SILVA FILHO, A.A.; BASTOS, J.K. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx. **Microbiol. Res.**, v. 159, n. 4, p.317-22, 2004.
- SONMEZ, S.; KIRILMAZ, L.; YUCESoy, M.; YÜCEL, B.; YILMAZ, B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 102, p. 371-376, 2005.
- SOUZA, M.C.M.; ITO, I.Y.; AZEVEDO, D.O.; OLIVEIRA, N.C.A. "Staphylococcus aureus" Estudo de sua ocorrência hospitalar em pacientes, em funcionários e em fômites de unidade de queimados. **JBM – J. Bras. Med.**, v. 59 (1), p.24-30, 1990.
- STEINBERG, D., KAINE, G., GEDALIA, I., Antibacterial effects of propolis and honey on oral bacteria., **American Journal of Dentistry**, 9 (6), p. 236-239, 1996.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; NEPOMUCENO, D.C., YOUNES, R.N., VARELLA, A.D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts – Clusiaceae. **Mememoriais do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n°. 3, p. 287-290, 2006.

SUFFREDINI, I.B.; SADER, H.S.; GONÇALVES, A.G.; REIS, A.O.; GALES, A.C.; VARELLA, A.D. AND YOUNES, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native do the Brazilian Amazon rains forest and Atlantic forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 379-384, 2004.

SUKLA, A., RASIK, A.M.; PATNAIK, K. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. **Free Radical Research**, v. 26, p. 93-101, 1997.

TROSIC, I.; BUSLJETA, I.; KASUBA, V.; ROZGAJ, R. Micronucleus induction after whole-body microwave irradiation of rats. **Mutation Research**, v. 26, p. 73-79, 2002.

VARGAS, A.C. de, LOGUERCIO, A.P., WITT, N.M., COSTA, M.M. da, SILVA, M.S., VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VIJAYALAXMI; PICKARD, W. F.; BISHT, K. S.; PRIHODA, T. J.; MELTZ, M. L.; LAREGIN, M. C.; ROTI, J. L.; STRAUBE, W. L.; MOROS, E. G. Micronuclei in the peripheral blood and bone marrow cells on exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation. **Internationa Journal of Radiation Biology**, v.77, p.1109-1115, 2001.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I. E SOSNOWSKI, A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV)., **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p.1-6, 2000.

VOLPERT, R., ELSTNER, E.F. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytic enzymes. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 46 (I), p. 47-51, 1996.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. London, Blackwell Scientific Publications, 1994.

WITEBSKY, F.G.; MACLOWRY, J.D. AND FRENCH, S.S. Broth dilution minimum inhibitory concentrations: rationale for use of selected antimicrobial concentrations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n° 5, p. 589-595, 1979.

WOISKY, R.G; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n.2, p.99-105, 1998.