UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANTONIO MÁRCIO SCATOLINI

**Estudo de hidroxiapatita contendo própolis de origem brasileira:
caracterização, atividade antimicrobiana e efeito citotóxico dos
materiais**

Pirassununga

2017

ANTONIO MÁRCIO SCATOLINI

**Estudo de hidroxiapatita contendo própolis de origem brasileira:
caracterização, atividade antimicrobiana e efeito citotóxico dos
materiais**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de
Mestre em Engenharia e Ciência dos
Materiais

Área de Concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação de Materiais
voltados à Agroindústria

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Cristina da
Silva Rigo

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S287e Scatolini, Antonio Márcio
Estudo de hidroxiapatita contendo própolis de origem
brasileira: caracterização, atividade antimicrobiana e efeito
citotóxico dos materiais / Antonio Márcio Scatolini ; orientadora
Eliana Cristina da Silva Rigo. -- Pirassununga, 2017.
126 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo.

1. Biomaterial. 2. Hidroxiapatita. 3. Antibacteriano. 4.
Própolis. I. Rigo, Eliana Cristina da Silva, orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

ANTONIO MÁRCIO SCATOLINI

**Estudo de hidroxiapatita contendo própolis de origem brasileira:
caracterização, atividade antimicrobiana e efeito citotóxico dos materiais**

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eliana Cristina da Silva Rigo – Presidente da Banca Examinadora – Departamento de Ciências Básicas – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Orientadora

Prof. Dr. Mariza Pires de Melo – Departamento de Ciências Básicas – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin – Departamento de Engenharia de Biossistemas – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Prof. Dr. Eduardo Quinteiro – Instituto de Ciência e Tecnologia – Universidade Federal de São Paulo

Pirassununga, 03 de Agosto de 2017.

*Às pessoas mais importantes da minha vida, minha esposa
Hilciléia, meu filho João e meus pais Orivaldo e Maria Teresinha;*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e à intercessão de Nossa Senhora, sempre me protegendo, me iluminando e me dando forças para viver um dia de cada vez;

À Profª Drª Eliana Cristina da Silva Rigo, minha orientadora, por sua amizade, paciência e principalmente pela confiança em meu trabalho e por ter compartilhado sua sabedoria e experiência. Obrigado, Lica!;

À Profª Drª Mariza Pires de Melo, pelas suas contribuições no exame de qualificação e por disponibilizar o laboratório e equipamentos para realização deste trabalho. Muito Obrigado!

À especialista de laboratório Silvana Marina Piccoli Pugine, pela amizade, paciência, por compartilhar sua experiência e competência profissional, pelas sugestões e auxílio na realização das análises, na elaboração dos gráficos, enfim, em tudo! Silvana, Deus abençoe você e sua linda família;

Ao Prof. Dr. Fernando Gustavo Tonin, pelas sugestões no exame de qualificação, por ser uma pessoa acessível e de boa conversa. Obrigado por transmitir sua experiência e conhecimento;

À Drª Patrícia Goldschmidt Lins, pela amizade, pela agradável convivência no laboratório e por suas contribuições e sugestões na elaboração deste trabalho. Muito obrigado por compartilhar sua experiência e competência;

À Especialista de Laboratório Luci Cristina de Oliveira Vercik, pela contribuição na obtenção da hidroxiapatita, pela realização das análises de microscopia eletrônica de varredura e pela amizade e agradável convivência no laboratório. Muito obrigado, Luci;

À Especialista de Laboratório Giovana Krempel Fonseca Merigue, pelo auxílio, treinamento e acompanhamento nas análises de citotoxicidade. Muito obrigado por compartilhar sua experiência;

À Empresa Natucentro, pelo fornecimento da própolis utilizada neste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelo conhecimento transmitido;

Aos colegas de Pós-graduação, Felipe Habitzreuter e Carolina Gomez, pelo convívio, amizade e constantes trocas de experiência;

Ao Especialista de Laboratório Marcelo Thomazini, pelo auxílio na utilização do atomizador;

Ao Especialista de Laboratório Rodrigo Lourenço, pelo auxílio na análise de espectroscopia na região do infravermelho;

Ao Técnico de Laboratório Leonardo Pozzobon, pela realização das análises de difração de raios X;

Aos funcionários da Biblioteca, em especial ao Diretor Técnico Marcelo Roberto Dozena, por disponibilizar a versão impressa das diretrizes para elaboração de dissertações e teses na FZEA-USP e a Bibliotecária Vanessa Rodrigues, por realizar a revisão deste trabalho.

Ao Serviço de Pós-graduação, pela competência e excelente atendimento prestado em todas às vezes que solicitei;

Ao Departamento de Ciências Básicas pelo apoio para que este trabalho pudesse ser realizado;

Aos meus amigos Ulysses e Maria Elena e aos compadres Benê e Regeane, pelo companheirismo, lealdade e caráter. A companhia de vocês e os momentos de descontração fazem a diferença em nossas vidas;

À toda minha família Campos (que é enorme) e Scatolini (um pouco menor) pelo apoio nos momentos mais difíceis e por confiarem na minha capacidade;

Aos meus pais Orivaldo e Teresinha e meu irmão Antonio Augusto, que sempre me amaram e me apoiaram, principalmente, quando mais precisei. Amo vocês!!!;

E, finalmente, ao meu filho João e à minha esposa Hilciléia, companheira, guerreira, que sempre me acompanhou e me apoiou nos desafios e nos momentos mais difíceis, acreditando na minha capacidade de superação e confiando que para Deus, nada é impossível (O impossível, Ele pode realizar). Amo vocês com toda a força do meu coração!!!

*Talvez não tenha feito o melhor, mas fiz tudo
para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.*

(Martin Luther King Jr.)

RESUMO

SCATOLINI, A. M. **Estudo de hidroxiapatita contendo própolis de origem brasileira: caracterização, atividade antimicrobiana e efeito citotóxico dos materiais**. 2017. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O objetivo deste trabalho foi produzir hidroxiapatita (HA) contendo diferentes tipos de própolis de origem brasileira e avaliar a possível atividade antimicrobiana dos materiais. Os extratos etanólicos de própolis (EEP) vermelha, verde e marrom foram obtidos em solução alcoólica 80%. EEP verde e vermelha (8 mg/mL e 20 mg/mL) foram incorporados ao material a 10% (m/v) via atomização (*spray drying*), obtendo-se HA-GP8, HA-GP20, HA-RP8 e HA-RP20. Os EEP e os materiais foram caracterizados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides totais. A atividade antimicrobiana dos EEP foi avaliada por difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) frente à *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). Os pós de HA incorporados com própolis foram avaliados frente à *S. aureus* por contagem de colônias bacterianas em placa, CIM e CBM. A caracterização dos materiais foi realizada por difração de raios X (DRX), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). A citotoxicidade foi determinada pelo cálculo da viabilidade celular, realizada pelo método de incorporação do vermelho neutro. Para os extratos, o conteúdo de fenólicos variou entre 278,3 e 325,6 mg EAG/g ES. EEP vermelha mostrou maior conteúdo de flavonoides (112,4 mg EQ/g ES) em relação aos outros EEP (48,4 e 52,3 mg EQ/g ES), apresentando maior atividade inibitória (CIM) frente à *S. aureus* e *S. Epidermidis* (12,5 µg/mL), comparado ao EEP verde (100 e 200 µg/mL) e marrom (200 µg/mL). Para CBM, os EEP vermelha e verde foram mais efetivos (800 µg/mL) comparado ao EEP marrom (1600 µg/mL), frente às mesmas bactérias. Entretanto, não foi observada atividade frente à *E. coli*. A caracterização dos pós incorporados ou não com própolis apresentou estrutura cristalina e morfologia aparentemente esférica, indicando diminuição no grau de aglomeração com a adição de própolis. FTIR indicou a presença de grupos funcionais característicos para HA e própolis. Os materiais apresentaram alta liberação de fenólicos (228,3 a 327,6 mg EAG/g ES) e menores quantidades de flavonoides (14,0 a 35,8 mg EQ/g ES), sendo as maiores quantidades de flavonoides atribuída à HA contendo própolis vermelha. Foi verificado efeito bactericida a partir de 0,5 h (HA-RP20 e HA-GP20) e 1 h (HA-RP8 e HA-GP8) e menor atividade inibitória (CIM) para HA-GP20 e HA-GP8 (175,4 e 182,0 µg/mL) e para HA-RP20 e HA-RP8 (51,7 e 66,8 µg/mL), comparado aos EEP. Entretanto, observou-se maior atividade bactericida (CBM) para HA-GP20 e HA-GP8 (701,5 e 728,0 µg/mL) e para HA-RP20 e HA-RP8 (206,5 e 267,0 µg/mL), em relação aos EEP. O ensaio de citotoxicidade mostrou valores para IC₅₀ (concentração que reflete 50% da viabilidade celular) de 387,1 e 84,8 µg/mL para as amostras HA-GP8 e HA-RP8, respectivamente. Considerando os resultados obtidos neste trabalho, sugere-se que a HA incorporada com própolis (HA-GP8 e HA-RP8) pode ser utilizada como possível agente antimicrobiano, inibindo o crescimento de *S. aureus*, respeitando-se os valores máximos para IC₅₀. Entretanto, não poderia ser utilizada como agente bactericida, uma vez que nestas condições os materiais apresentaram efeito citotóxico.

Palavras-chave: biomaterial, hidroxiapatita, antibacteriano, própolis.

ABSTRACT

SCATOLINI, A. M. **Study of hydroxyapatite containing propolis of Brazilian origin: characterization, antimicrobial activity and cytotoxic effect of materials.** 2017. 125 f. M.Sc Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The aim of this study was to produce hydroxyapatite (HA) containing different types of propolis of Brazilian origin and to evaluate the possible antimicrobial activity materials. The ethanolic extracts of red, green and brown propolis (EEP) were obtained in alcoholic solution 80%. Green and red EEP (8 mg / mL and 20 mg / mL) were incorporated into the 10% (m/v) via atomization (spray drying), obtaining HA-GP8, HA-GP20, HA-RP8 and HA -RP20. EEP and materials were characterized regarding the content of phenolic compounds and total flavonoids. The antimicrobial activity of the EPS was evaluated by diffusion in agar, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (MBC) against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*) and *Escherichia coli* (*E. coli*). The HA powders incorporated with propolis were evaluated against *S. aureus* by plate colony counting, CIM and CBM. Materials characterization was made by X-ray diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The cytotoxicity of the materials was determined by cell viability calculation, which was made by the neutral red incorporation method. For extracts, phenolic content ranged from 278.3 to 325.6 mg EAG/g ES. The red EEP showed a higher flavonoid content (112.4 mg EQ/g ES) than the other EEP (48.4 and 52.3 mg EQ/g ES), showing a higher inhibitory activity (MIC) against *S. aureus* and *S. epidermidis* (12.5 µg/mL) compared to green EEP (100 and 200 µg/mL) and brown (200 µg/mL). For CBM, red and green EEP were more effective (800 µg/mL) compared to brown EEP (1600 µg/mL) against the same bacteria. However, no activity was observed against *E. coli*. The characterization of the powders incorporated or not with propolis presented crystalline structure and apparently spherical morphology, indicating a decrease in the degree of agglomeration with the addition of propolis. FTIR indicated the presence of functional groups characteristic for HA and propolis. The materials presented high phenolic release (228.3 to 327.6 mg EAG/g ES) and lower amounts of flavonoids (14.0 to 35.8 mg EQ/g ES), with the highest amounts of flavonoids attributed to HA containing red propolis. The bactericidal effect for all materials was observed within the interval of 0.5 (HA-RP20 and HA-GP20) to 1 hour (HA-RP8 and HA-GP8). The materials showed lower inhibitory activity (MIC) for HA-GP20 and HA-GP8 (175, 4 and 182.0 µg/mL) and for HA-RP20 and HA-RP8 (51.7 and 66.8 µg/mL) compared to EEP. However, higher bactericidal activity (MBC) was observed for HA-GP20 and HA-GP8 (701.5 and 728.0 µg/mL) and for HA-RP20 and HA-RP8 (206.5 and 267.0 µg/mL) when compared to the EEP. The cytotoxicity assay showed values for IC₅₀ (concentration that reflects 50% of cellular viability) of 387.1 and 84.8 µg/mL for HA-GP8 and HA-RP8 samples, respectively. Considering the results obtained in this work, it is suggested that HA incorporated with propolis (HA-GP8 and HA-RP8) can be used as a possible antimicrobial agent, inhibiting the growth of *S. aureus*, respecting the maximum values for IC₅₀. However, it could not be used as a bactericidal agent, since under these conditions the materials had a cytotoxic effect.

Keywords: biomaterial, hydroxyapatite, antibacterial, propolis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação do organismo a um material sintético implantado.	23
Figura 2 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita.	30
Figura 3 - Própolis <i>in natura</i> marrom (A), verde (B) e vermelha (C).	34
Figura 4 - Estrutura química básica de um composto fenólico (A), ácido fenólico (ácido gálico) (B), flavonoide (C) e isoflavonoide (D).	36
Figura 5 - Características da parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. ...	38
Figura 6 - Fluxograma representando as etapas do desenvolvimento experimental do trabalho.	46
Figura 7 - Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha (A), verde (B) e marrom (C) em concentrações de extrato variando de 200 a 0,78 mg/mL, frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	65
Figura 8 - Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha (A), verde (B) e marrom (C) em concentrações de extrato variando de 200 a 0,78 mg/mL, frente à <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.	66
Figura 9 - Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha (A), verde (B) e marrom (C) em concentrações de extrato variando de 200 a 0,78 mg/mL, frente à <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	67
Figura 10 - Determinação da CIM, utilizando corante resazurina, na presença de: Branco (A1 e A2), crescimento bacteriano (B1 e B2), controle positivo (C1 e C2), controle negativo (D1 e D2), EEP marrom (colunas 3 e 4), EEP verde (colunas 5 e 6), EEP vermelha (colunas 7, 8, 9 e 10) em concentrações seriadas variando de 1600 a 12,5 µg/mL para os EEP marrom e verde, e de 1600 a 0,78 µg/mL para o EEP vermelha. São exibidas as placas para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (A), <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (B) e <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (C).	69
Figura 11 - Determinação da CBM para os EEP frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. São exibidas as imagens para EEP marrom (A), EEP verde (B) e EEP vermelha (C).	71
Figura 12 - Determinação da CBM para os EEP frente à bactéria <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228. São exibidas as imagens para EEP marrom (A), EEP verde (B) e EEP vermelha (C).	72
Figura 13 - Espectros de DRX para os extratos secos de própolis verde e vermelha.	76
Figura 14 - Espectros de DRX para as amostras HA-ETOH80, HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8.	77
Figura 15 - Imagens de MEV para os extratos secos de própolis verde (A) e vermelha (B). ..	77

Figura 16 - Imagens de MEV para as amostras HA-ETOH80 (A), HA-GP20 (B) e HA-GP8 (C).....	79
Figura 17 - Imagens de MEV para as amostras HA-ETOH80 (A), HA-RP20 (B) e HA-RP8 (C).....	80
Figura 18 - Espectros de FTIR para os extratos secos de própolis verde e vermelha.	82
Figura 19 - Espectros de FTIR para HA-ETOH80, HA-GP8 e HA-GP20.	84
Figura 20 - Espectros de FTIR para HA-ETOH80, HA-RP8 e HA-RP20.....	84
Figura 21 - Espectros de absorção na região do UV-visível para os extratos etanólicos de própolis verde e vermelha.....	87
Figura 22 - Espectros de absorção na região do UV-visível para as amostras HA-GP20 (A) e HA-GP8 (B).....	88
Figura 23 - Espectros de absorção na região do UV-visível para as amostras HA-GP20 (A) e HA-GP8 (B).....	90
Figura 24 - Conteúdo de fenólicos totais, liberado em função do tempo, para as amostras HA-RP20, HA-RP8, HA-GP20 e HA-GP8.	92
Figura 25 - Conteúdo de flavonoides totais, liberado em função do tempo, para as amostras HA-RP20, HA-RP8, HA-GP20 e HA-GP8.	92
Figura 26 - Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, formadas após contato das amostras com a suspensão bacteriana nos tempos zero h (A), 0,5 h (B), 1 h (C), 2 h (D) e 4 h (E).....	96
Figura 27 - Porcentagem de redução bacteriana, ao longo do tempo, para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 utilizando as amostras HA-GP20 e HA-GP8 (A) e HA-RP20 e HA-RP8 (B).	97
Figura 28 - Determinação da CIM utilizando corante resazurina, frente à <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, na presença de: Branco (A1 e A2), crescimento bacteriano (B1 e B2), controle positivo (C1 e C2) e controle negativo (D1 e D2). São exibidas as imagem para as liberações (4 h) das amostras HA-GP20 e HA-GP8 (A); HA-RP20 e HA-RP8 (B).....	100
Figura 29 - Determinação da CBM frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. São exibidas as imagens para a amostra HA-GP20 (A), HA-GP8 (B), HA-RP20 (C) e HA-RP8 (D).....	101
Figura 30 - Curva de viabilidade celular para as amostras HA-GP8, HA-RP8, HA-ETOH80 e controles negativo (alumina) e positivo (fenol) pela incorporação de VN, utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de Hamster chinês).	104
Figura 31 - Curva de viabilidade celular em função da concentração para as amostras HA-GP8 (A) e HA-RP8 (B), utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de ramster Chinês).	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades de alguns fosfatos de cálcio.	27
Tabela 2 - Métodos de síntese e características para alguns CaP.	28
Tabela 3 - Classificação da própolis brasileira de acordo com a origem geográfica.	35
Tabela 4 - Quantidade de fenólicos e flavonoides totais para os extratos de própolis.	61
Tabela 5 - Valores das médias dos halos de inibição do crescimento das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus epidermidis</i>	64
Tabela 6 - Valores para CIM e CBM utilizando os EEP contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228.	73
Tabela 7 - Atribuição dos sinais obtidos em FTIR para os extratos secos de própolis verde e vermelha.	82
Tabela 8 - Atribuição dos sinais obtidos em FTIR para HA-ETOH80.	85
Tabela 9 - Quantidade de fenólicos e flavonoides totais para os EEP verde e vermelha e para as liberações no tempo 4 horas.	93
Tabela 10 - Valores para CIM, CBM (<i>S. aureus</i>), fenólicos e flavonoides totais para os EEP e para as liberações no tempo 4 horas.	102
Tabela 11 - Valores para atividade citotóxica (IC ₅₀) e antibacteriana (CIM e CBM) para as amostras HA-GP8 e HA-RP8.	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BioLab	Laboratório de Biomateriais e Biossensores
CaP	Fosfato de cálcio
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CHO-K1	Célula de ovário de hamster Chinês
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DCPA	Fosfato dicálcico amorfo
DCPD	Fosfato dicálcico di-hidratado
DRX	Difração de raios X
EAG	Equivalente em ácido gálico
EDS	Espectroscopia de raios X por energia dispersiva
EEP	Extrato etanólico de própolis
EQ	Equivalente em quercetina
ES	Extrato seco
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
GP	Própolis verde
HA	Hidroxiapatita
HA-GP	Hidroxiapatita contendo própolis verde (via <i>spray drying</i>)
HA-RP	Hidroxiapatita contendo própolis vermelha (via <i>spray drying</i>)
HA-ETOH80	Hidroxiapatita controle obtida via <i>spray drying</i> apenas com etanol 80%
HeLa	Linhagem celular cancerosa de origem humana

IC ₅₀	Concentração de amostra que reflete 50% da viabilidade celular
LAPROF	Laboratório de Produtos Funcionais
LBQ	Laboratório de Química Biológica
LTA	Laboratório de Tecnologia de Alimentos
MCPA	Fosfato monocálcico anidro
MCS	Meio de cultura suplementado
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Meio de cultura ágar <i>Mueller Hinton</i>
MultiMat	Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais
OCP	Fosfato octacálcico
PBS	Tampão salino fosfato
PVA	Álcool polivinílico
RFC	Reagente de Folin-Ciocalteau
RP	Própolis vermelha
SUS	Sistema Único de Saúde
TSB	Meio de cultura caldo <i>Trypticase Soy Broth</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VC	Viabilidade celular
VN	Vermelho neutro
ZAB	Departamento de Ciências Básicas
ZEA	Departamento de Engenharia de Alimentos
ZEB	Departamento de Engenharia de Biosistemas
α -TCP	α -Fosfato tricálcico
β -TCP	β -Fosfato tricálcico

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	Átomo de cálcio
P	Átomo de fósforo
OH ⁻	Íon hidroxila
Ca ⁺²	Íon cálcio
Al ⁺³	Íon alumínio
PO ₄ ⁻³	Íon fosfato
Pb ⁺²	Íon chumbo
Cd ⁺²	Íon cádmio
Cu ⁺²	Íon cúprico
Zn ⁺²	Íon zinco
Sr ⁺²	Íon estrôncio
Co ⁺²	Íon cobalto
Fe ⁺²	Íon ferroso
CO ₃ ⁻²	Íon carbonato
F ⁻	Íon fluoreto
Cl ⁻	Íon cloreto
VO ₄ ⁻³	Íon vanadato
AsO ₄ ⁻³	Íon arsenato
Mg ⁺²	Íon magnésio
Na ⁺	Íon sódio
K ⁺	Íon potássio
%	Porcentagem
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico

NaCl	Cloreto de sódio
Ca(OH) ₂	Hidróxido de cálcio
H ₂ O	Água
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
μm	micrômetro
rpm	Rotações por minuto
mg/mL	miligramas por mililitro
v/v	volume por volume
μL	microlitro
m/v	massa por volume
nm	nanômetro
mg/g	miligrama por grama
μg/mL	micrograma por mililitro
Kgf/cm ²	kilograma força por centímetro quadrado
UFC/mL	Unidade formadora de colônias por mililitro
M	Molar
Å	Angstrom
λ	Comprimento de onda
kV	Kilovolt
mA	miliampere
PDF	<i>Powder Diffraction File</i>
KBr	Brometo de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio dibásico
Ton.	Tonelada

min.	minuto
cm ⁻¹	unidade de frequência
mg	miligrama
µg	micrograma
mL	mililitro
µm	micrômetro
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
mM	milimolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BIOMATERIAIS	22
3.1.1 <i>Biocerâmicas</i>	24
3.2 FOSFATOS DE CÁLCIO	25
3.2.1 <i>Hidroxiapatita</i>	28
3.3 INFECÇÕES RELACIONADAS AOS BIOMATERIAIS	31
3.4 PROPRIEDADES GERAIS DA PRÓPOLIS	34
3.4.1 <i>Atividade antibacteriana da própolis</i>	37
3.4.2 <i>Aplicação da própolis em biomateriais</i>	40
3.5 HIDROXIAPATITA CONTENDO AGENTE ANTIMICROBIANO	42
4 METODOLOGIA	45
4.1 PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS	47
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS	47
4.2.1 <i>Determinação do conteúdo de fenólicos totais</i>	47
4.2.2 <i>Determinação do conteúdo de flavonoides totais</i>	48
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS	48
4.3.1 <i>Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha, verde e marrom</i>	49
4.3.2 <i>Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)</i>	49
4.3.3 <i>Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)</i>	50
4.4 PREPARO DO MATERIAL	50
4.4.1 <i>Síntese da hidroxiapatita</i>	50
4.4.2 <i>Preparo do pó de hidroxiapatita contendo própolis (Atomização)</i>	51
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	52
4.5.1 <i>Difração de raios X (DRX)</i>	52
4.5.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	53
4.5.3 <i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	53
4.6 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE PRÓPOLIS AO LONGO DO TEMPO	54

4.6.1 Ensaio de liberação	54
4.6.2 Análise Espectrofotométrica.....	55
4.6.3 Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais	55
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MATERIAIS	55
4.7.1 Contagem de colônias bacterianas em placas	55
4.7.2 Determinação da CIM e CBM para os materiais.....	56
4.8 AVALIAÇÃO IN VITRO UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS	57
4.8.1 Cultura de células.....	58
4.8.2 Viabilidade celular - método de incorporação do vermelho neutro (VN)	59
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	61
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS	63
5.2.1 Teste de difusão em ágar	63
5.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)	68
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS	75
5.4 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE PRÓPOLIS AO LONGO DO TEMPO	85
5.4.1 Análise Espectrofotométrica.....	85
5.4.2 Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais	91
5.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MATERIAIS	94
5.5.1 Contagem de colônias bacterianas em placa	94
5.5.2 Determinação da CIM e CBM.....	98
5.6 VIABILIDADE CELULAR - MÉTODO DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO	103
6 CONCLUSÕES.....	108
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	109
REFERÊNCIAS	110
ANEXO.....	126

1 INTRODUÇÃO

Existe, nos dias atuais, a grande necessidade de cirurgias reconstrutivas nas áreas ortopédica e odontológica, devido a fatores como idade avançada, acidentes automobilísticos e doenças ósseas. Dentre as cirurgias realizadas na área ortopédica, podem-se destacar as artroplastias de quadril e joelho, enquanto, na área odontológica, destacam-se as cirurgias de implante dentário, que ocorrem devido ao aumento da expectativa de vida e razões estéticas.

A hidroxiapatita (HA) é um biomaterial cerâmico que representa o principal componente da parte mineral dos ossos. Apresenta, como característica principal, a bioatividade, promovendo a ligação química com a parte mineral dos ossos (osteointegração), favorecendo o crescimento do tecido sobre o material implantado (osteocondução). Pode ser utilizada como material de implante, atuando na reconstrução de defeitos ósseos, ou como recobrimento de próteses metálicas ou cerâmicas. Além disso, pode ser utilizada quando há a necessidade de aumento ósseo ou tratamento de doença óssea, podendo atuar associada a fármacos, permitindo a liberação da droga *in situ*.

Entretanto, o sucesso da cirurgia de implante dentário e ortopédico depende tanto da osteointegração como do combate às infecções, que podem ocorrer no momento da cirurgia. Apesar da rigorosa assepsia no procedimento cirúrgico e uso de antibióticos no pré e pós-operatório, é grande a necessidade de cirurgias de revisão ou substituição de prótese, causadas por infecções, aumentando a insatisfação do paciente e custos médicos. Neste sentido, diversos tratamentos de hidroxiapatita dopada com agentes antimicrobianos têm sido propostos com a finalidade de reduzir as infecções relacionadas aos implantes ósseos. Entre eles, a utilização de alguns metais e drogas, utilizados em associação com a hidroxiapatita, atuando como antibacterianos no local do implante.

A própolis tem sido investigada em diversos trabalhos científicos, destacando-se por apresentar algumas propriedades biológicas e farmacológicas como, antioxidante, antiviral, antifúngica e antibacteriana. Sua atividade biológica tem sido atribuída à composição química do material, mais especificamente à presença de compostos fenólicos e flavonoides. Além disso, a própolis tem sido utilizada em biomateriais, principalmente em biopolímeros, atuando como potente agente antimicrobiano natural.

Desta forma, este trabalho visou obter hidroxiapatita contendo diferentes tipos de própolis de origem brasileira e avaliar a atividade antibacteriana dos materiais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi obter hidroxiapatita com a adição de diferentes tipos de própolis de origem brasileira e avaliar a possível atividade antimicrobiana dos materiais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Realizar a extração hidroalcoólica dos diferentes tipos de própolis.
- b) Caracterizar os extratos através da determinação das quantidades de compostos fenólicos e flavonoides totais.
- c) Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de própolis através do teste de difusão em ágar, determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).
- d) Sintetizar a hidroxiapatita via precipitação química e incorporar os diferentes tipos de própolis utilizando a técnica de atomização (*spray drying*).
- e) Avaliar a liberação de própolis através de análise espectrofotométrica na região do UV-visível e determinar o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais.
- f) Caracterizar os materiais obtidos utilizando as técnicas de difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).
- g) Avaliar a atividade antibacteriana da HA contendo própolis através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e contagem de colônias em placas.

h) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da HA contendo própolis utilizando o método de incorporação do vermelho neutro.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BIOMATERIAIS

O uso dos biomateriais, tanto na área ortopédica como na área odontológica, tem crescido nos últimos anos, implicando na melhora da qualidade de vida das pessoas. A grande necessidade de utilização dos biomateriais justifica-se pelo aumento da expectativa de vida e, outros fatores, como traumas, lesões e doenças (BHULLAR; LALA; RAMKRISHNA, 2015). Trata-se de uma das técnicas mais antigas utilizadas em procedimentos cirúrgicos e continua sendo utilizada como prática moderna. Em decorrência da evolução tecnológica, abrange uma categoria crescente de produtos que podem ser derivados tanto do tecido humano ou animal como de produtos naturais ou sintéticos (BANYARD et al., 2015).

Biomaterial, então, pode ser definido como um dispositivo médico projetado para interagir com um sistema biológico (BANYARD et al., 2015), com capacidade de se incorporar a um tecido vivo devido a biocompatibilidade, ou seja, ausência de efeitos como toxicidade local, irritação, inflamação, efeitos mutagênicos e carcinogênicos (KAO et al., 2007). Além disso, um biomaterial deve ser biofuncional, atendendo as solicitações físicas e mecânicas necessárias para o bom desenvolvimento de suas atividades (PIGHINELLI; KUCHARSKA, 2013), além de apresentar baixo custo e facilidade de produção. A tecnologia necessária para o desenvolvimento dos biomateriais envolve diversas áreas do conhecimento como: química, física, engenharia de materiais, engenharia mecânica, medicina, biologia, entre outras (RATNER; BRYANT, 2004). Podem, ainda, ser classificados de acordo com sua origem como: naturais (humano, animal ou vegetal) ou sintéticos (polímeros, metais e cerâmicos) (VALLET-REGI, 2001).

Quando um tecido é lesionado, o organismo inicia uma resposta através de uma série de etapas complexas que podem resultar na remodelação completa do tecido ou na formação de uma eventual cicatriz. Entretanto, quando um biomaterial é implantado, o organismo responde de forma também complexa, porém diferente, resultando em eventual formação de tecido fibroso, como ilustrado na Figura 1 (RATNER; BRYANT, 2004).

Figura 1 - Reação do organismo a um material sintético implantado.

Fonte: RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: Where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 6, p. 45, 2004.

Neste contexto, os biomateriais podem ser classificados de acordo com a resposta biológica do tecido hospedeiro (HENCH; WILSON, 1993; VALLET-REGI; GONZALEZ-CALBET, 2004), como:

- **Biotoleráveis:** Materiais que são aceitos pelo organismo, porém isolados dos tecidos adjacentes através de uma camada de tecido fibroso. A formação do tecido é induzida por substâncias produzidas e liberadas pelo material implantado como: corrosão, íons, entre outros. Quanto maior a camada envoltória de tecido fibroso, menor será a tolerância do

organismo ao material. Os materiais biotoleráveis compreendem quase todos os polímeros sintéticos e a maioria dos metais, sendo os mais utilizados o aço inoxidável e as ligas de cromo-cobalto.

- **Bioinertes:** São materiais tolerados pelo organismo com formação de praticamente nenhuma camada de tecido fibroso. Quando há a formação, a camada apresenta espessura muito fina. O material não libera praticamente nenhuma substância que induz a formação do tecido fibroso e, quando há a liberação, as doses são mínimas. Os materiais mais utilizados são alumina, zircônia, titânio e ligas de titânio.

- **Bioativos:** Materiais que possuem a propriedade de favorecer a ligação química entre a superfície do implante e o material ósseo (osteointegração), não apresentando a formação de camada fibrosa sobre o material. Devido à similaridade química entre o material implantado e a parte mineral óssea, o tecido se liga quimicamente ao implante, permitindo a osteocondução, ou seja, o recobrimento do material por células ósseas. Essa classe de materiais é representada pelos biovidros, vitrocerâmicas e hidroxiapatita.

- **Reabsorvíveis:** Materiais que, após um período de tempo em contato com os tecidos, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. A utilização desses materiais é interessante do ponto de vista clínico pois descarta a necessidade de nova intervenção cirúrgica para retirada do material. Os principais exemplos são o fosfato tricálcico e o ácido polilático.

3.1.1 Biocerâmicas

De modo geral, os materiais cerâmicos são definidos como materiais inorgânicos, de caráter não metálico, onde os átomos estão fortemente unidos por ligações iônicas ou covalentes (CHEVALIER; GREMILLARD, 2009). Apresentam como vantagens a dureza, resistência ao desgaste, resistência ao ataque químico e estabilidade a altas temperaturas e, como desvantagem, alta rigidez e fragilidade (VALLET-REGI, 2001).

As biocerâmicas podem ser definidas como materiais cerâmicos utilizados em meio biológico, ou ainda, como um biomaterial cerâmico. Sua aplicação está relacionada aos implantes de substituição ou restauração dos tecidos duros (ossos e dentes) doentes ou danificados (ARCOS; VALLET-REGI, 2013).

Os materiais biocerâmicos surgiram no final da década de sessenta, como opção aos materiais metálicos utilizados em cirurgias ortopédicas (SMITH et al., 2012), pois o ambiente

biológico é um meio úmido, favorecendo o processo oxidativo de próteses metálicas com consequente desprendimento do material e ocorrência de inflamação e dor.

Desta forma, o principal uso de materiais biocerâmicos, como peça de reposição, está relacionado a degeneração do tecido ósseo causada por doenças, traumas ou idade avançada. Em pessoas idosas, a estrutura óssea torna-se vulnerável a fratura devido a perda de densidade óssea e da resistência mecânica. Esse efeito é mais pronunciado em mulheres que sofrem de alterações hormonais associadas à menopausa. A densidade óssea diminui porque as células do tecido ósseo (osteoblastos) tornam-se menos produtivas, diminuindo a produção óssea e reparação de tecido danificado. A menor densidade resulta em menor resistência mecânica, podendo ocorrer fraturas e problemas de coluna (HENCH, 1998).

A utilização das biocerâmicas abrange um vasto campo da medicina, como em implantes dentário, ouvido médio, craniano, maxilofacial, coluna vertebral e outros. Alumina e zircônia fazem parte da primeira geração de biocerâmicas utilizadas para fabricar cabeças femorais em artroplastias de quadril. Sua aplicação justifica-se pelas características bioinertes e boas propriedades mecânicas. A segunda geração das biocerâmicas foi desenvolvida e implantada baseada nas características biorreabsorvíveis e bioativas, ou seja, na reatividade química do material e capacidade de interação com o tecido ósseo, eliminando a formação de material fibroso, inflamação ou toxicidade na interação com o organismo. Os materiais a base de fosfato de cálcio (CaP) e os vidros bioativos são os elementos mais representativos desta segunda geração de biocerâmicas (HENCH; WILSON, 1991; HENCH, 1991).

3.2 FOSFATOS DE CÁLCIO

As biocerâmicas a base de CaP apresentam uma vasta aplicação nas áreas ortopédica e odontológica, podendo ser utilizadas como preenchimento em defeitos ósseos, tanto na forma de biocerâmicas reabsorvíveis ou bioativas, dependendo da necessidade de cada caso (DOROZHKIN, 2010). A principal característica que justifica o uso dos CaP como biomateriais é a sua semelhança com a parte mineral (Ca e P) dos ossos e dentes. (DOROZHKIN, 2009). Além disso, não apresentam toxicidade, são biocompatíveis, reabsorvíveis ou bioativas, sendo capaz de induzir reações biológicas que resultam na formação de tecido ósseo com a superfície do implante por meio de ligações químicas (osteointegração), levando ao recobrimento do implante por células ósseas (osteocondução) (DAVIES, 1996; LEGEROS; CRAIG, 1993). Uma limitação do uso das biocerâmicas à base

de CaP são as propriedades mecânicas, pois são materiais frágeis e apresentam baixa resistência à fadiga. Desta forma, suas aplicações como biomateriais são voltadas, principalmente, como preenchimento e recobrimento, não sendo possível a reconstrução de grandes defeitos ósseos (DOROZHKIN, 2007; HENCH, 1991).

Os parâmetros mais importantes relacionados aos CaP são: a relação molar Ca/P, a acidez-alcalinidade e a solubilidade. Quanto menor for a relação Ca/P, maior será a solubilidade e mais ácida será a solução em meio aquoso. Assim, os compostos de fosfatos de cálcio que apresentam razão molar Ca/P menor que 1,0 não são adequados para utilização como biomateriais, devido à alta solubilidade e acidez (DOROZHKIN, 2010; ELLIOT, 1994; LEGEROS, 1991). A Tabela 1 apresenta os valores destes parâmetros para vários fosfatos de cálcio.

Tabela 1 - Propriedades de alguns fosfatos de cálcio.

Ca/P	Fórmula	Nome	Solubilidade a 25°C (g/L)	Faixa de pH em solução aquosa a 25°C
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	~ 18	0 - 2.0
0,5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Fosfato monocálcico anidro (MCPA)	~ 17	a
1	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dicálcico di-hidratado (DCPD)	~ 0,088	2.0 - 6.0
1	CaHPO_4	Fosfato dicálcico anidro (DCPA)	~ 0,048	a
1,33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcico (OCP)	~ 0,0081	5.5 - 7.0
1,5	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	α -Fosfato tricálcico (α -TCP)	~ 0,0025	b
1,5	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β -Fosfato tricálcico (β -TCP)	~ 0,0005	b
1,2-2,2	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	-	5.0-12.0
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita (HA)	~ 0,0003	9.5 - 12.0
1,67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	Fluorapatita (FA)	~ 0,0002	7.0 - 12.0
2	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Fosfato tetracálcico (TTCP)	~ 0,0007	b

a: não precipitam abaixo de 100°C; b: não precipitam em solução aquosa.

Fonte: adaptado de: DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 1468, Mar 2010.

Diversos métodos são utilizados para obtenção dos CaP, tais como: precipitação química, reação do estado sólido, mecânico-químico, sol-gel, hidrotérmico, combustão, pirólise, entre outros (LIN; WU; CHANG, 2014). A escolha do método e os parâmetros utilizados durante o processo de síntese desempenham papel fundamental nas características do material obtido (WANG et al., 2006). A Tabela 2 apresenta alguns métodos de síntese de CaP e suas características.

Tabela 2 - Métodos de síntese e características para alguns CaP.

Método	Características do produto		Vantagens	Desvantagens
	Tamanho	Tipo		
<i>Seco</i>	<i>Estado sólido</i>	Mícrom	α -TCP, β -TCP, HA	Baixo custo, larga escala, Formação de agregados
	<i>Mecânico-químico</i>	Nano a microm	HA e misturas de CaP	Baixo custo, larga escala, Formação de agregados
<i>Químico via úmida</i>	<i>Precipitação</i>	Nano a microm	MCPA, DCPD, DCPA, OCP, ACP, β -TCP, HA e misturas de CaP	Baixo custo, larga escala, Formação de agregados, distribuição de tamanho ampla
	<i>Sol-gel</i>	Nano	ACP, β -TCP, HA e misturas de CaP	Distribuição de tamanho estreita, Alto custo, necessita de reagentes especiais
	<i>Hidrotérmico</i>	Nano a microm	DCPD, DCPA, OCP, β -TCP, HA	Alto custo, distribuição de tamanho ampla, Baixo rendimento, consumo de energia, formação de agregados
<i>Alta temperatura</i>	<i>Combustão</i>	Nano a submicrom	β -TCP, HA e misturas de CaP	Baixo custo, Consumo de energia, formação de agregados
	<i>Pirólise</i>	Nano a microm	β -TCP, HA e misturas de CaP	Baixo custo, formação de agregados

Fonte: adaptado de: LIN, K. L.; WU, C. T.; CHANG, J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 10, n. 10, p. 4072, Oct 2014.

Dentre os diversos métodos, a precipitação química é um dos mais simples para obtenção de CaP, onde as características do produto final são geralmente controladas pelo tempo de reação, temperatura e tempo de envelhecimento (LOO et al., 2008).

3.2.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é o fosfato de cálcio mais utilizado como biomaterial, devido a sua semelhança com a parte mineral dos ossos. Ossos e dentes dos vertebrados são compostos por 65% de HA carbonatada, sendo o restante formado por matéria orgânica e água. A HA carbonatada presente nos ossos apresenta um teor de 4 a 8% de carbonato, que diminui com o

avanço da idade, enquanto o teor de fosfato aumenta. Os cristais presentes na matriz orgânica apresentam escala nanométrica e baixa cristalinidade. Os dentes apresentam características muito semelhantes aos ossos, diferenciando apenas pela presença de revestimento de esmalte (VALLET-REGI; GONZALEZ-CALBET, 2004).

A HA apresenta estrutura cristalina pertencente ao sistema hexagonal, com maior possibilidade de arranjo da célula ao longo do eixo c, o que justificaria sua morfologia em forma de agulha. Pode, também, ser analisada como um conjunto de fosfatos atravessado por canais paralelos preenchidos pelos íons OH^- , paralelamente ao eixo c. A HA estequiométrica apresenta razão Ca/P igual a 1,67 com fórmula molecular $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e características como: biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade. A Figura 2 apresenta a estrutura cristalina da HA (HEIMANN, 2013; VALLET-REGI; GONZALEZ-CALBET, 2004).

Os íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^- , presentes na HA, podem sofrer substituições na rede cristalina. Essas substituições podem resultar em algumas mudanças nas propriedades, como: parâmetros de rede, morfologia, cristalinidade, solubilidade, entre outros. Dentre as trocas catiônicas, podemos citar as substituições que ocorrem pelos íons Pb^{+2} , Cd^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Sr^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} . As substituições aniônicas ocorrem quando os íons CO_3^{-2} , F^- , Cl^- , substituem o íon OH^- e quando os íons CO_3^{-2} , VO_4^{-3} , e AsO_4^{-3} substituem o íon PO_4^{-3} (BOANINI; GAZZANO; BIGI, 2010).

A hidroxiapatita biológica não é estequiométrica, podendo conter traços de alguns íons como: cátions (Mg^{+2} , Na^+ , K^+) e ânions (CO_3^{-2} , F^- , Cl^-), sendo a substituição mais comum a que ocorre pelo íon carbonato (CO_3^{-2}). Quando o íon CO_3^{-2} substitui o íon OH^- , a HA é chamada do tipo A. Por outro lado, quando o íon CO_3^{-2} substitui o íon PO_4^{-3} , a HA é chamada de Tipo B (OKADA; FURUZONO, 2012).

Figura 2 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Fonte: VALLET-REGI, M.; GONZALEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, Kidlington, v. 32, n. 1-2, p. 6, 2004.

A hidroxiapatita pode ser obtida tanto nas formas densas, porosas ou em pó e sua aplicação abrange as áreas ortopédica e odontológica, atuando principalmente na reconstrução, aumento e preenchimento do tecido ósseo. Existem vários métodos para obtenção de hidroxiapatita que podem ser classificados como: via seca (reação do estado sólido, reação mecânico-químico e *plasma spraying*) e via úmida (precipitação química, conversão hidrotermal, precipitação homogênea, sol-gel e emulsão). A síntese via seca utiliza altas temperaturas e longos períodos de tratamento e, de modo geral, apresenta uma HA estequiométrica e cristalina. A síntese via úmida é realizada com maior facilidade, entretanto, são necessários controles rígidos no processo a fim de garantir cristalinidade e relação Ca/P favorável. A HA sintética destinada ao uso biológico deve apresentar íons CO_3^{2-} , sendo a síntese via úmida o método mais indicado (OKADA; FURUZONO, 2012; VALLET-REGI; GONZALEZ-CALBET, 2004).

Portanto, a síntese via úmida, utilizando a metodologia de precipitação química é amplamente utilizada, devido a simplicidade e baixo custo de processo. A mistura de soluções de ácido ortofosfórico e hidróxido de cálcio, em meio alcalino, resulta na rápida precipitação de HA, de acordo com a eq.(1) (MANUEL et al., 2004).

O processo de obtenção de HA via precipitação química pode produzir fases intermediárias (precursores) e alterações morfológicas (forma e tamanho), dependendo das condições utilizadas no processo. Neste sentido, deve-se adotar controle rígido nas concentrações dos reagentes, pH da solução, condições de mistura e controle de temperatura (LEE et al., 2012; OKADA; FURUZONO, 2012).

3.3 INFECÇÕES RELACIONADAS AOS BIOMATERIAIS

Artroplastias de quadril e joelho são os procedimentos cirúrgicos mais comumente realizados nos Estados Unidos, devido ao aumento tanto da expectativa de vida, como do estilo de vida das pessoas através das atividades físicas. Em 2004, foram realizadas 225.000 artroplastias de quadril e 431.000 artroplastias de joelho, com estimativa de 600.000 e 1,4 milhões para artroplastias de quadril e joelho, respectivamente, para o ano de 2015 (KIM, 2008).

Um dos efeitos mais prejudiciais associados às cirurgias de implantes são as infecções, sendo necessário, em alguns casos, a realização de cirurgias de revisão. As infecções em artroplastias podem causar afrouxamento na interface osso/implante, mau posicionamento, desgaste ou fratura do material, aumentando o tempo de permanência no hospital, causando incapacitação do indivíduo além de gerar custos elevados para o sistema de saúde (KURTZ et al., 2012; TANDE; PATEL, 2014). Em relação ao número total de cirurgias de artroplastias realizadas entre 2001 e 2009, nos Estados Unidos, houve um aumento de 1,99% para 2,18% nos casos de infecção em artroplastia de quadril e de 2,05% para 2,18% em artroplastias de joelho (KURTZ et al., 2012). As infecções relacionadas às artroplastias de ombro e cotovelo apresentam valores em torno de 1,1% e 3,3%, respectivamente (SINGH et al., 2012; VOLOSHIN et al., 2011).

As infecções associadas às artroplastias causam impacto significativo na economia dos Estados Unidos. Em 2009, foram gastos 566 milhões de dólares em cirurgias de revisão causadas por infecções. Estima-se que esse valor possa atingir 1,62 bilhões de dólares em 2020. Entretanto, deve-se observar que os custos estimados contabilizam apenas os gastos diretos com hospital, desconsiderando outros gastos indiretos. O custo total envolvendo um único paciente irá depender da estratégia adotada no procedimento cirúrgico, sendo que as cirurgias de revisão, envolvendo infecções, são mais onerosas que as cirurgias de revisão causadas por outras razões. Dependendo da estratégia adotada na cirurgia de revisão, o custo

pode chegar a 3 vezes o valor inicial do implante e, se houver necessidade de troca do material, esse valor pode atingir até 6 vezes o valor da cirurgia inicial. Além disso, deve-se contabilizar o tempo de imobilidade do paciente submetido à cirurgia de revisão e o custo com o uso de antimicrobianos via oral (KLOUCHE; SARIALI; MAMOUDY, 2010; KURTZ et al., 2012; PEEL et al., 2013; VANHEGAN et al., 2012).

No Brasil, em 2015, os gastos do Sistema Único de Saúde (SUS) ultrapassaram 130 milhões de reais em artroplastias de quadril e joelho, sendo que apenas no primeiro semestre de 2016, estes gastos já superavam os 86 milhões de reais para os mesmos procedimentos cirúrgicos (BRASIL, 2016).

Entre os fatores de risco envolvendo infecções em artroplastias, observa-se maior ocorrência em determinados grupos de pessoas que possuem as seguintes características: sexo masculino, obesidade, diabetes, artrite reumatoide, tabagismo e antecedentes microbianos no ano anterior à cirurgia. Estudos indicam que a maior incidência de infecções (60 a 70 %) relacionadas às artroplastias, ocorrem até 12-24 meses após o procedimento cirúrgico (TANDE; PATEL, 2014).

As infecções causadas em artroplastias podem ser classificadas de acordo com o tempo de infecção como: início precoce e início tardio. As infecções classificadas como início precoce ocorrem até 3 meses após o procedimento cirúrgico. Normalmente, elas têm início no momento da cirurgia por contaminação intraoperatório e são causadas por microrganismos de relativa virulência. As infecções de início tardio também ocorrem no momento da cirurgia, entretanto, elas se manifestam no período de 3 a 24 meses após a cirurgia e são causadas por microrganismos menos virulentos (TANDE; PATEL, 2014).

As infecções podem, ainda, ser divididas em três classificações como: tipo I, II e III. As infecções do tipo I são chamadas de infecções pós-operatórias precoces e ocorrem dentro do primeiro mês após a cirurgia. As infecções do tipo II são chamadas de infecções crônicas tardias e ocorrem entre 1 a 24 meses após o procedimento cirúrgico. As infecções do tipo III são denominadas de infecções hematogênicas agudas e ocorrem, geralmente, após 2 anos do procedimento cirúrgico, sendo a menos frequente. Os esquemas de classificação das infecções são importantes para determinar o tipo de tratamento ou procedimento cirúrgico a ser adotado pela equipe médica (MCPHERSON et al., 2002; TSUKAYAMA; ESTRADA; GUSTILO, 1996).

Dentre os microrganismos causadores das infecções em artroplastias, pode-se destacar *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Staphylococcus epidermidis* (*S. Epidermidis*) (50 a 60%

dos casos) e *Escherichia coli* (*E. coli*) (< 10% dos casos) (TANDE; PATEL, 2014). O microrganismo *S. aureus* representa um importante agente patogênico devido a sua alta virulência e alta frequência. *S. epidermidis* apresenta alta virulência e alta capacidade de formação de biofilmes em materiais implantados. *E. coli* apresenta menor incidência e são mais comuns nas infecções do tipo I (FEY; OLSON, 2010; WISPLINGHOFF et al., 2004; ZMISTOWSKI et al., 2011).

Diversas medidas de prevenção são adotadas visando a redução da incidência de infecções relacionadas aos materiais implantáveis. Dentre os procedimentos, destacam-se: assepsia de pele, tendo como alvo principal os *S. aureus* (SEWICK et al., 2012); utilização de fluxo de ar laminar na sala de cirurgia, reduzindo consideravelmente a quantidade de partículas contaminadas suspensas no ar (LIDWELL et al., 1982); profilaxia antimicrobiana no perioperatório (período que compreende o pré-operatório até o pós-operatório) (ALBUHAIRAN; HIND; HUTCHINSON, 2008); profilaxia antimicrobiana no pré-operatório utilizada nos procedimentos de implante ortopédico e odontológico (AMERICAN DENTAL; AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPEDIC, 2003). Embora alguns estudos indiquem a redução dos casos de infecções utilizando profilaxia com antibióticos, sabe-se que as bactérias se tornam resistentes a essa terapia (DIEKEMA et al., 2001). Além disso, para os procedimentos odontológicos, estudos revelam que a profilaxia com antimicrobianos não é eficaz na redução das infecções no pós-operatório (BERBARI et al., 2010).

Além das infecções relacionadas aos procedimentos cirúrgicos, pode-se considerar também aquelas causadas por doenças ósseas como a osteomielite. Neste sentido, a osteomielite pode ser definida como um processo inflamatório acompanhado pela deterioração do tecido ósseo causada por microrganismos (NANDI et al., 2009). De modo geral, estas infecções são causadas por bactérias, sendo *S. aureus* o principal microrganismo responsável pela doença (RISSING, 1997; SIMPSON; DEAKIN; LATHAM, 2001). O tratamento inclui desbridamento cirúrgico com remoção de corpos estranhos, além de terapia com antibióticos pelas vias intravenosa e oral. No entanto, além de causar toxicidade ao paciente, a terapia pode ser ineficiente, apresentando altas taxas de recidiva, necessitando assim de terapias alternativas para o tratamento da doença (PRICE et al., 1996; GENTRY, 1997). Neste contexto, os produtos naturais apresentam diversas propriedades farmacológicas, sendo amplamente utilizados na medicina popular como uma opção alternativa aos medicamentos de uso comum (CHINSEMBU, 2016; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN,

2016; SILVA et al., 2016). Assim, a busca por novos medicamentos que apresentem características antimicrobianas tem sido intensa e atenção especial pode ser dada a própolis.

3.4 PROPRIEDADES GERAIS DA PRÓPOLIS

A utilização da própolis data desde a antiguidade, sendo empregada na conservação de alimentos ou como medicamentos, porém, nos últimos anos, o interesse por esse produto natural tem aumentado, devido às suas características químicas, biológicas e farmacológicas. Neste sentido, diversos estudos têm demonstrado algumas propriedades biológicas e farmacológicas da própolis. Entre elas, pode-se citar as ações antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e antibacteriana (CHAN; CHEUNG; SZE, 2013; HU et al., 2005; MARCUCCI, 1995; SFORCIN; BANKOVA, 2011; VALENTE et al., 2011).

A própolis pode ser definida como um produto natural resinoso, formada por uma mistura complexa de compostos coletados de plantas e misturados com cera e saliva de abelhas. A palavra própolis é de origem grega e significa: "*pro*" (defesa) e "*poli*" (cidade). O material resinoso é utilizado pelas abelhas como proteção das colmeias e contra o ataque de predadores e microrganismos. Além disso, a própolis também é utilizada como reparadora de danos na colmeia e isolante térmico. É um material duro e quebradiço à temperatura mais baixa, entretanto, quando aquecido, torna-se flexível e pegajoso. Possui aroma agradável e diferentes colorações, incluindo vermelho, verde e marrom (Figura 3) (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; MARCUCCI, 1995; UMTHONG et al., 2011). A própolis de origem brasileira apresenta diferenças em sua composição química, dependendo do tipo de vegetação local, e pode ser classificada em 13 tipos diferentes, de acordo com sua origem geográfica (Tabela 3) (TORETI et al., 2013).

Figura 3 - Própolis *in natura* marrom (A), verde (B) e vermelha (C).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 3 - Classificação da própolis brasileira de acordo com a origem geográfica.

Tipo	Cor	Origem geográfica
Grupo 1 (G1)	Amarelo	Sul
Grupo 2 (G2)	Marrom	Sul
Grupo 3 (G3)	Marrom escuro	Sul
Grupo 4 (G4)	Marrom	Sul
Grupo 5 (G5)	Marrom esverdeado	Sul
Grupo 6 (G6)	Marrom avermelhado	Nordeste
Grupo 7 (G7)	Marrom esverdeado	Nordeste
Grupo 8 (G8)	Marrom escuro	Nordeste
Grupo 9 (G9)	Amarelo	Nordeste
Grupo 10 (G10)	Amarelo escuro	Nordeste
Grupo 11 (G11)	Amarelo	Nordeste
Grupo 12 (G12)	Verde ou Marrom esverdeado	Sudeste
Grupo 13 (G13)	Vermelha	Nordeste

Fonte: Adaptado de: TORETI, V. C. et al. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, 2013.

A padronização da composição química da própolis é muito difícil, pois depende das diferentes características fitogeográficas como vegetação, estação do ano e condições ambientais do local da coleta. De modo geral, a produção da própolis, realizada pelas abelhas, é feita através da seleção de diferentes plantas em diferentes locais. Além disso, estudos relatam que a própolis possui mais de 300 substâncias identificadas. A composição química do material pode ser considerada como uma mistura de 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de minerais e outros compostos orgânicos. Dentre os compostos orgânicos, pode-se citar os compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos (ácido cinâmico, ácido cafeico), ésteres, flavonoides (flavonas, isoflavonas, entre outros), terpenos, aldeídos aromáticos, alcoóis e ácidos graxos (BANKOVA, 2005; BANKOVA, et al., 2000; BARLAK et al., 2011; SFORCIN, 2016; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Neste contexto, os compostos fenólicos podem ser denominados como uma classe de substâncias químicas cuja principal característica da molécula é a presença de um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxilas. O ácido fenólico é um tipo de composto fenólico caracterizado pela presença de um anel aromático contendo um grupamento carboxílico, podendo ser derivado do ácido benzoico ou do ácido cinâmico. Os flavonoides

são considerados um tipo de composto fenólico caracterizado pela presença de 15 átomos de carbono com configuração C6-C3-C6, podendo conter vários grupos hidroxilas ligados a sua estrutura, sendo divididos em classes como, flavonas, flavonóis, antocianidinas, isoflavonoides, entre outros (MALESEV; KUNTIC, 2007; STALIKAS, 2007). A Figura 4 ilustra a estrutura básica de algumas destas substâncias.

Figura 4 - Estrutura química básica de um composto fenólico (A), ácido fenólico (ácido gálico) (B), flavonoide (C) e isoflavonoide (D).

(A)

(B)

(C)

(D)

Fonte: Adaptado de: STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, Dec 2007.

Desta forma, a própolis brasileira tem despertado interesse em pesquisas científicas devido a sua composição química. Alguns compostos como os fenilpropanoides prenilados, ácidos p-cumárico prenilados, ácidos diterpênicos e acetofenonas, são facilmente encontrados na própolis proveniente da região sudeste do Brasil, característicos das própolis verde e marrom (BANKOVA, 2005; BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; FALCAO et al., 2013), além de flavonoides como kaempferol, kaempferide e isosakuranetina (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). A coloração verde ou marrom apresentada pela própolis do sudeste brasileiro se deve a clorofila presente nas folhas da planta *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como alecrim-do-campo (SALATINO et al., 2005). O principal composto químico

encontrado na própolis verde de origem brasileira é o ácido fenólico artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), que pode ser considerado como um marcador químico deste produto (FERNANDES-SILVA et al., 2013; SIMOES et al., 2004).

A própolis vermelha tem origem no nordeste brasileiro, nas regiões dos mangues, sendo que sua coloração se deve ao vermelho intenso da seiva da planta leguminosa *Dalbergia ecastophyllum*, conhecida como rabo-de-bugio (DAUGSCH et al., 2008). Este tipo de própolis desperta muito interesse pela composição química, pois apresenta grandes quantidades de ácidos fenólicos e flavonoides como formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina e biochanina A (FROZZA et al., 2013; SILVA et al., 2008). Em outro estudo, os autores avaliaram a composição química da própolis vermelha brasileira e observaram a presença de flavonoides como, formononetina, rutina, liquiritigenina, daidzeína e quercetina (DAUGSCH et al., 2008). Os isoflavonoides podem ser considerados como marcadores químicos para própolis vermelha de origem brasileira, entre eles, formononetina, medicarpina, biochanina A e pinocembrina (LOPEZ et al., 2014; TRUSHEVA et al., 2006).

Portanto, a composição química dos diferentes tipos de própolis é muito variável o que torna sua padronização extremamente complexa. Assim, diferentes tipos de própolis podem apresentar diferentes propriedades biológicas, entretanto, amostras diferentes também podem apresentar propriedades semelhantes (SFORCIN, 2016). Desta forma, dentre as propriedades biológicas apresentadas pela própolis, especial atenção tem sido dada a atividade antibacteriana atribuída ao material.

3.4.1 Atividade antibacteriana da própolis

A atividade antibacteriana da própolis é uma das características farmacológicas mais investigadas deste material. A sua atividade frente a alguns agentes patogênicos tem sido muito estudada nos últimos anos visando tratamentos alternativos no combate às infecções, uma vez que os microrganismos desenvolvem resistência aos antibióticos de uso comum (SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015). Diversos estudos demonstram que a própolis apresenta características bacteriostáticas frente a alguns microrganismos, inibindo a motilidade bacteriana (CAMPOS et al., 2015; LOPEZ et al., 2015; SCHMIDT et al., 2014a ;SFORCIN et al., 2000). Em concentrações mais elevadas, o material também pode ser bactericida, afetando a membrana citoplasmática (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997). De modo geral, o mecanismo de ação antimicrobiana da

própolis tem sido atribuída a presença de compostos fenólicos e também ao efeito sinérgico entre eles (DARWISH et al., 2010), provocando alterações funcionais e estruturais, como danos na membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição do metabolismo energético e inibição da formação de biofilmes, além de aumentar a permeabilidade da membrana, provocando lise e morte celular (BRYAN; REDDEN; TRABA, 2016; SFORCIN, 2016; XIE et al., 2015).

A própolis tem apresentado melhores resultados, como agente antimicrobiano, frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e é menos ativa frente às bactérias Gram-negativas (*E. coli*) (BENHANIFIA et al., 2014; KUJUMGIEV et al., 1999; SCHMIDT et al., 2014a; SFORCIN et al., 2000), o que pode ser explicado pelas diferenças na parede celular entre os dois tipos de microrganismos, uma vez que as bactérias Gram-negativas possuem a parede celular com natureza mais complexa. Além disso, a presença de grande quantidade de lipopolissacarídeos na parede celular das bactérias Gram-negativas impede a entrada de substâncias químicas potencialmente antibacterianas (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997). A Figura 5 ilustra as diferenças na parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.

Figura 5 - Características da parede celular das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa.

Fonte: Adaptado de: MICROBIOENERGETICA. Disponível em: <<http://microbioenergetica.squarespace.com/bacteriologia/2014/7/21/bacterias-gram-positivas>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

Dentre a complexa composição química da própolis, os compostos fenólicos e, mais especificamente, os flavonoides, são considerados os principais responsáveis pela atividade

biológica apresentada pelo material (BANKOVA et al., 1995; BANKOVA et al., 1996). O método de extração e o solvente utilizado podem modificar a composição química do extrato de própolis. De maneira geral, os produtos de uso comercial e na grande maioria dos trabalhos científicos, é utilizado extrato etanólico. A extração com metanol pode ser realizada, porém o extrato é utilizado apenas para fins científicos (TORETI et al., 2013).

Vários autores têm estudado a atividade antibacteriana utilizando extrato etanólico de própolis (EEP). Bryan, Redden e Traba (2016) estudaram o mecanismo de ação de EEP de origem Russa frente à *S. aureus* e *E. coli*. Os autores observaram danos na membrana celular, causados pelos compostos presentes nos extratos, provocando lise e consequente morte bacteriana. Bittencourt et al. (2015) avaliaram a atividade dos EEP verde e marrom de origem brasileira, frente à algumas cepas Gram-positivas. Os resultados indicaram que o EEP marrom foi mais eficiente na inibição do crescimento bacteriano para cepas de *S. aureus*, comparado ao EEP verde. Campos et al. (2015) avaliaram a composição química, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana contra *S. aureus* e *S. epidermidis* utilizando EEP brasileira. Os extratos apresentaram efeito bactericida frente a todos os microrganismos, sugerindo a aplicação do material nas indústrias farmacêutica e alimentícia. Benhanifia et al. (2014) avaliaram a atividade antioxidante e antibacteriana de EEP, observando que todas as amostras apresentaram inibição do crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Entretanto, não foi observada atividade antibacteriana contra cepas de *E. coli*. De acordo com os autores, os resultados indicaram que a própolis poderia ser utilizada como conservante na indústria de alimentos. Astani et al. (2013) verificaram a atividade de EEP frente à *S. aureus*, indicando que o material poderia ser utilizado no desenvolvimento de produtos alternativos para o tratamento de infecções microbianas.

Outros autores têm investigado o efeito do EEP vermelha como possível agente antimicrobiano. Machado B. A. S. et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de EEP vermelha, verde e marrom de origem brasileira, frente à *S. aureus* e *E. coli*. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*). Além disso, os resultados indicaram maior atividade antibacteriana para os extratos de própolis vermelha. Lopez et al. (2015) analisaram a atividade antibacteriana de EEP vermelha de diferentes regiões do Brasil e Cuba. Todas as amostras apresentaram resultados satisfatórios frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Alencar et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante, antimicrobiana e efeitos citotóxicos utilizando EEP própolis vermelha de origem brasileira. Foram descobertos novos compostos químicos pertencentes à classe das

isoflavonas e verificada ação antibacteriana frente à *S. aureus*, além de comprovada ação citotóxica contra células tumorais HeLa. Cabral et al. (2012) investigaram a atividade de EPP vermelha e verde, originárias do Brasil. Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana frente à bactéria *S. aureus*. Além disso, EEP vermelha também apresentou efeito citotóxico contra células tumorais HeLa. Oldoni et al. (2011) produziram EEP vermelha de origem brasileira, observando a atividade antibacteriana frente à *S. aureus*, indicando o produto como antioxidante e antimicrobiano para a indústria alimentícia.

3.4.2 Aplicação da própolis em biomateriais

Atualmente, diversos trabalhos têm demonstrado o uso da própolis associada aos biomateriais, visando a obtenção de um dispositivo que possa ser utilizado no meio biológico e também apresente características antimicrobianas. Neste sentido, o biomaterial contendo a própolis atuaria como sistema de liberação de antimicrobianos *in situ* (ADOMAVICIUTE et al., 2016; ALTUNSOY et al., 2016; DE LIMA et al., 2016; HATUNOGLU et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015)

Há um grande interesse, tanto dos pesquisadores, como da indústria, em desenvolver um biomaterial que apresente características antimicrobianas de alta qualidade e com segurança para o paciente (KENAWY; WORLEY; BROUGHTON, 2007). Desta forma, alguns polímeros têm apresentado grande interesse, devido ao baixo custo de produção e vasta área de aplicação (STRATTON et al., 2010; STRATTON; RICKUS; YOUNGBLOOD, 2009). Neste sentido, a própolis tem sido associada a biopolímeros visando melhora nas propriedades físicas, aliada a atividade antimicrobiana do produto final (ADOMAVICIUTE et al., 2015; ADOMAVICIUTE et al., 2016; DE LIMA et al., 2016; KIM et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; SUTJARITTANGTHAM et al., 2014).

Adomaviciute et al. (2016) utilizaram a técnica de *eletrospinning* para produzir material utilizado como curativo de feridas de polivinilpirrolidona (PVP), contendo extrato de própolis e nanopartículas de prata. Os resultados demonstraram rápida liberação de fenólicos e maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* para as amostras contendo prata. O material foi indicado para o desenvolvimento de novos produtos que estimulem a cicatrização de feridas. De Lima et al. (2016) obtiveram hidrogéis de álcool de polivinil (PVA) e ácido poliacrílico (PAA) contendo própolis, materiais utilizados nas indústrias médica e farmacêutica. Os autores verificaram inibição do crescimento bacteriano para *S. aureus* e *E.*

coli. Oliveira et al. (2015) produziram hidrogel de álcool de polivinil (PVA) incorporado com própolis, um biomaterial para ser utilizado como curativo de feridas provocadas por queimaduras. Os resultados apresentaram propriedades mecânicas adequadas para a aplicação e atividade antibacteriana contra *S. aureus*, atuando como barreira à penetração do microrganismo. Barud et al. (2013) desenvolveram membrana de celulose contendo própolis, material utilizado na cicatrização de feridas. Os resultados apresentados demonstram que a membrana foi capaz de adsorver a própolis na superfície e em seus interstícios. O biomaterial apresentou inibição do crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*, sugerindo que a membrana/própolis favorece a reparação de tecidos contaminados em menos tempo e de forma mais eficaz. Kim et al. (2014) utilizaram a própolis em nanofibras de poliuretano, biomaterial utilizado em engenharia tecidual. Os resultados mostraram que a incorporação de pequena quantidade de própolis apresentou melhora na hidrofiliabilidade e aumento da resistência mecânica da membrana fibrosa, atuando ainda como inibidor do crescimento de *E. coli*. Em outros estudos, quitosana contendo própolis foi preparada visando avaliar a atividade antibacteriana do material frente a produção de biofilmes relacionados às bactérias cariogênicas. Os resultados demonstraram que o material produzido foi eficaz contra todos os microrganismos testados, não apresentando efeito citotóxico significativo (DE LUCA et al., 2014; FRANCA et al., 2014).

Própolis associada a materiais cerâmicos também demonstram atividade antimicrobiana (BONFIM et al., 2009; HATUNOGLU et al., 2014). Hatunoglu et al. (2014) obtiveram cimento de ionômero de vidro contendo própolis, material utilizado em restauração dentária. Os autores relataram atividade inibitória do crescimento da bactéria *Streptococcus mutans* para as amostras contendo a maior quantidade de própolis e ausência de alterações nas propriedades mecânicas dos materiais com a adição de própolis. Em estudo realizado por Bonfim et al. (2009), foram obtidos biovidros contendo EEP verde e vermelha. Os materiais contendo EEP apresentaram inibição do crescimento de diversos microrganismos, incluindo *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que o material incorporado com própolis vermelha foi mais eficiente contra todos os microrganismos, comparado com o biovidro incorporado com própolis verde, sugerindo a aplicação terapêutica do material contra agentes infecciosos relacionados à cavidade oral.

3.5 HIDROXIAPATITA CONTENDO AGENTE ANTIMICROBIANO

Dentre as diversas estratégias que podem ser utilizadas no controle das infecções em dispositivos médicos, a rota que conduz à modificação das propriedades da superfície e incorporação de agentes antimicrobianos aos biomateriais, visando a prevenção do crescimento bacteriano, tem se mostrado muito interessante. Atualmente, há um grande interesse na utilização de nanopartículas de metais como, prata, zinco e cobre, devido ao amplo espectro antimicrobiano frente a vários microrganismos (DIZAJ et al., 2014; KNETSCH; KOOLE, 2011).

Neste contexto, a prata é conhecida há muitos anos por apresentar excelente atividade antimicrobiana frente a uma ampla variedade de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. Possui atividade antimicrobiana em pequenas doses, sem apresentar efeitos citotóxicos significativos em células de mamíferos. Além disso, os microrganismos possuem pouca capacidade de desenvolver imunidade frente ao metal (KOLMAS; GROSZYK; KWIATKOWSKA-ROZYCKA, 2014). Andrade et al. (2016) produziram HA contendo nanopartículas de prata. Os autores verificaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli* para todas as amostras produzidas, sendo indicado para desenvolvimento de biomateriais com características antimicrobianas. Braissant et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana de HA dopada com prata e relataram a inibição do crescimento de *S. epidermidis*. Carmona et al. (2014) desenvolveram hidroxiapatita contendo nanopartículas de prata em concentrações variadas. Foi observado que HA contendo 1% de prata apresentou atividade bactericida frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*, não demonstrando efeito citotóxico. Yan et al. (2014) sintetizaram HA dopada com prata via deposição eletroquímica e observaram atividade bactericida contra *E. coli*, não apresentando efeito citotóxico considerável. Radovanovic et al. (2014) sintetizaram HA dopada com prata utilizando o método hidrotérmico e observaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*. O material obtido não apresentou efeito citotóxico, sendo indicada sua utilização em cirurgias de reconstrução do tecido ósseo.

Outro metal também utilizado em associação com a hidroxiapatita é o cobre, pois trata-se de um micronutriente presente em quase todos os organismos vivos e está envolvido em diversos processos metabólicos. Suas propriedades antimicrobianas datam desde 2600-2200 aC, quando era utilizado em ferimentos e na esterilização para obtenção de água potável

(DOLLWET; SORENSON, 1985). Huang et al. (2015) utilizaram HA dopada com cobre para recobrimento de titânio, via deposição eletrolítica, e observaram atividade antimicrobiana frente ao microrganismo *E. coli*. Além disso, o material também apresentou resistência a corrosão, boa bioatividade *in vitro* e nenhum efeito citotóxico, sugerindo sua utilização em aplicações biomédicas. Stanic et al. (2010) verificaram a inibição do crescimento dos microrganismos *S. aureus* e *E. coli* para todas as amostras de HA contendo cobre. Os testes realizados em meio líquido também demonstraram redução na quantidade de células viáveis dos mesmos microrganismos, indicando a possibilidade de utilização do material em preenchimento de defeitos ósseos e como recobrimento em implantes ortopédicos.

O zinco é um dos microelementos essenciais presente nos centros ativos de mais de 300 enzimas envolvidas no metabolismo ósseo. Além de apresentar características antimicrobianas, também exerce impacto direto sobre a ação proliferativa dos osteoblastos e efeito inibitório sobre a absorção óssea realizada pelos osteoclastos (KOLMAS; GROSZYK; KWIATKOWSKA-ROZYCKA, 2014). Tank et al. (2014) produziram HA dopada com zinco em concentrações variadas. Todas as amostras apresentaram inibição do crescimento de *S. aureus*. O material não apresentou efeito hemolítico, sendo indicado em aplicações de implante ósseo. Samani et al. (2013) sintetizaram HA contendo zinco e prata, via metodologia sol-gel e verificaram que todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana frente à *S. aureus*. As amostras contendo prata apresentaram maior atividade antimicrobiana, comparado com as amostras contendo zinco. Entretanto, as amostras que continham os dois íons, simultaneamente, apresentaram maior atividade contra o microrganismo, confirmando o efeito sinérgico devido a união dos metais. Radovanovic et al. (2012) avaliaram o efeito antimicrobiano de HA dopada com zinco obtida pelo método hidrotérmico. Os resultados obtidos demonstraram que o material apresenta atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *S. aureus* e *E. coli* e não houve efeito citotóxico significativo utilizando células de fibroblastos humano.

Além disso, estudos recentes demonstram a atividade antibacteriana de nanocompósitos de HA em associação com antibióticos como tetraciclina (MARYCZ et al., 2016; PLOUX et al., 2016), gentamicina (STRAVINSKAS et al., 2016), clorexidina (SORIANO-SOUZA et al., 2015) e ciprofloxacino (KRISHNAN et al., 2015) visando obter um biomaterial que apresente características antimicrobianas frente aos microrganismos causadores de infecções relacionadas aos ossos e dentes.

Finalmente, um único trabalho é reportado até o momento envolvendo HA incorporada com EEP. Grenho et al. (2015) incorporaram EEP verde e vermelha na superfície de pastilhas de HA e avaliaram a atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*. Os resultados mostraram que o biomaterial contendo própolis vermelha apresenta maior redução do crescimento microbiano em 24 horas, comparado a HA contendo EEP verde. O material não apresentou efeito citotóxico frente às células de fibroblastos de ratos, indicando sua utilização como preenchimento e revestimento em implantes dentários e ortopédicos, para promover o crescimento ósseo e prevenir a formação de infecções.

4 METODOLOGIA

O desenvolvimento experimental deste estudo foi realizado nos Laboratórios de Biomateriais e Biossensores (BioLab) e Química Biológica (LQB) do Departamento de Ciências Básicas (ZAB) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) na cidade de Pirassununga - SP (Brasil). A obtenção de hidroxiapatita contendo própolis, pelo processo de atomização, foi realizado no Laboratório de Produtos Funcionais (LAPROF) do Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA) e as caracterizações por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), no mesmo departamento. A caracterização por difração de raios X (DRX) foi realizada no Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (MultMat) do Departamento de Engenharia de Biossistemas (ZEB). Todos os laboratórios estão localizados na mesma faculdade.

As etapas do trabalho estão esquematizadas no fluxograma da Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma representando as etapas do desenvolvimento experimental do trabalho.

Fonte: Própria autoria.

4.1 PREPARO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS

As própolis *in natura* vermelha, verde e marrom foram obtidas da empresa Natucentro® (BambuÍ, Minas Gerais, Brasil). O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Alencar et al. (2007) e Bodini et al. (2013), com modificações. A extração foi realizada a 30% (m/v) em etanol 80% (80 etanol: 20 água) sob agitação a 50°C, por 30 minutos, utilizando banho com agitação (Banho-maria Q226M2, Quimis, Brasil). Após, os extratos foram mantidos em geladeira a 10°C, por 24 horas, e filtrados a vácuo utilizando papel de filtro (Qualy 14 µm). Para completa remoção de substâncias insolúveis, os extratos foram resfriados a -20°C, por 24 horas, e centrifugados a 3500 rpm por 10 minutos (Centrífuga CT 5000, Cientec, Brasil). Em seguida, os extratos foram secos a 50°C (Estufa de Secagem e Esterilização 315SE, Fanem, Brasil) e ressuspensos em etanol 80% de modo a obter soluções com concentração igual a 200 mg/mL. A extração foi realizada em três repetições independentes para cada amostra.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

4.2.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais

A quantidade de fenólicos totais dos EEP vermelha, verde e marrom foi determinada pela metodologia descrita por Singleton e Rossi Junior (1965), com modificações. O método é baseado no poder redutor da amostra frente ao reagente de Folin-Ciocalteu (RFC). O RFC é formado pela mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngstico, de coloração amarela. Em meio básico, ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos, gerando o íon fenolato, que reduz o molibdênio presente no RFC, formando os complexos molibdênio-tungstênio, de coloração azul. O método permite a determinação da concentração de substâncias redutoras, mas não necessariamente fenólicas (HUANG; OU; PRIOR, 2005; SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

A solução de Folin-Ciocalteu foi preparada utilizando o RFC a 10% (v/v), diluído em água ultra pura. A reação foi realizada pela mistura de 100 µL dos EEP vermelha, verde e marrom (80 µg/mL) e 500 µL da solução de RFC 10%. Após 2 minutos, adicionou-se 400 µL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Após 1 hora à 25°C e ao abrigo de luz, as absorbâncias foram medidas a 750 nm (Espectrofotômetro DU 800, Beckman Coulter, USA), utilizando como branco a mistura reacional contendo o solvente da amostra (etanol

80%). Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (EAG) em mg/g de extrato seco (ES), calculados a partir da curva padrão de ácido gálico (0,5 a 6 µg/mL). O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra.

4.2.2 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

A determinação do conteúdo de flavonoides totais foi realizada pela metodologia descrita por Miliauskas, Venskutonis e Van Beek (2004), com modificações. O princípio do método espectrofotométrico para determinação da quantidade de flavonoides totais, presentes em uma amostra, consiste na complexação do cátion alumínio (Al^{+3}) do cloreto de alumínio ($AlCl_3$) com as hidroxilas livres dos flavonoides, resultando em um deslocamento do máximo de absorção para regiões de maior comprimento de onda (MARQUES et al., 2012).

A reação foi realizada pela mistura de 50 µL dos EEP vermelha, verde e marrom (500 µg/mL) e 50 µL de solução alcoólica de cloreto de alumínio 2% (m/v), sendo o volume final ajustado para 1250 µL, utilizando etanol absoluto. Após 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, as absorbâncias foram medidas a 415 nm (Espectrofotômetro DU 800, Beckman Coulter, USA), utilizando como branco a mistura reacional contendo o solvente da amostra (etanol 80%). Os resultados de flavonoides totais foram expressos em equivalente de quercetina (EQ) em mg/g de ES, calculados a partir da curva padrão de quercetina (0,6 a 9,6 µg/mL). O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS

As análises antibacterianas dos EEP vermelha, verde e marrom foram realizadas utilizando cepas das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Todos os meios de cultura e materiais utilizados no ensaio foram esterilizados por via úmida, utilizando autoclave à temperatura de 120 °C e pressão de 1 Kg/cm² durante 20 minutos.

4.3.1 Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha, verde e marrom

A análise qualitativa da atividade antibacteriana das amostras foi realizada de acordo com metodologia descrita por Duarte et al. (2003) e Martin et al. (2013), com modificações. O princípio do método é baseado na difusão de um antimicrobiano através do meio contendo o microrganismo, resultando em um halo de inibição do crescimento bacteriano (SEJAS et al., 2003). As bactérias foram reativadas em meio *Trypticase Soy Broth* (TSB) a 37°C por 24 horas. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para $1-2 \times 10^8$ UFC/mL, o que corresponde a 0,5 da escala de Mac Farland. Para isto, a suspensão bacteriana foi diluída em meio TSB e os valores de absorbância ajustados para 0,1000 a 620 nm (Espectrofotômetro DU 800, Beckman Coulter, USA). Em seguida, o inóculo foi adicionado em meio ágar *Mueller Hinton* (MH) a 45°C, obtendo-se uma concentração bacteriana final de 1×10^5 UFC/mL e, imediatamente, distribuído em placas de Petri de 150 mm de diâmetro.

Após solidificação do meio, foram cortados os poços para adição dos extratos e dos controles, utilizando uma ponteira estéril de 1000 µL para preparação dos furos e uma ponteira estéril de 200 µL para retirada do material. Foram adicionadas 50 µL dos extratos (200 a 0,78 mg/mL), igual volume de etanol 80% (controle negativo) e gentamicina (20 µg/mL) (controle positivo).

As placas permaneceram por 1 hora à temperatura ambiente, para que o material pudesse se difundir no meio e, posteriormente, foram incubadas a 37°C por 24 horas (Estufa de Cultura Bacteriológica, Nova Ética, Brasil). Foram registradas imagens fotográficas e as medidas dos halos de inibição realizadas utilizando paquímetro digital. O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra.

4.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Duarte et al. (2003) e Koo et al. (2000), com modificações. O método é baseado na determinação da menor concentração de amostra necessária para inibir o crescimento bacteriano. Os microrganismos foram reativados e a suspensão bacteriana ajustada para concentração $1-2 \times 10^8$ UFC/mL em meio TSB, conforme descrito no item 4.3.1. Em seguida, a suspensão bacteriana foi diluída em meio TSB para concentração final igual a 1×10^5 UFC/mL.

Após a homogeneização, foram adicionados 4960 µL do meio TSB contendo a suspensão bacteriana (1×10^5 UFC/mL) e 40 µL dos extratos (concentrações seriadas finais variando de 1600 a 12,5 µg/mL), utilizando tubos de vidro com tampa de rosca. Foram realizados quatro controles: 1) com a adição de 40 µL de etanol 80% (controle negativo); 2) com a adição de 40 µL de gentamicina a 2,5 mg/mL (controle positivo); 3) com a adição de 40 µL solução tampão salino fosfato (PBS) pH 7,4 (crescimento bacteriano); 4) com a adição de 4960 µL do meio TSB (sem o inóculo) e 40 µL de etanol 80% (branco). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C, por 24 horas, sob agitação de 150 rpm (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil). Após a incubação, foi realizada leitura das absorbâncias em leitor de microplacas a 620 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA), utilizando placas de 96 poços (300 µL das amostras e controles em cada poço). A CIM foi considerada a menor faixa de concentração onde não houve crescimento bacteriano visível (absorbância menor 0,05). Para melhor visualização na placa, foi adicionado 5 µL do corante resazurina (3 mg/mL), onde a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano enquanto a coloração rosa indica a presença de bactérias viáveis. O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra.

4.3.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada conforme metodologia descrita por Koo et al. (2002) e Duarte et al. (2003), com modificações. Foram utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio ágar (MH). De acordo com os resultados obtidos para CIM, foram adicionados 100 µL das suspensões provenientes dos tubos que apresentaram resultado de leitura de absorbância inferior a 0,05. A CBM foi considerada a menor concentração onde não foi observado crescimento bacteriano visível sobre a placa.

4.4 PREPARO DO MATERIAL

4.4.1 Síntese da hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) foi preparada via precipitação química pela metodologia descrita por Rigo et al. (2007), com modificações. A reação de precipitação ocorre pela adição de grupos fosfatos (PO_4^{-3}) sobre soluções que contenham íons cálcio (Ca^{+2}). A reação de neutralização, utilizando ácido ortofosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$),

apresenta grande eficiência na produção de HA e apenas água como subproduto (RIGO, 1995).

A reação de precipitação da hidroxiapatita ocorreu através do gotejamento lento de 300 mL de H_3PO_4 (0,5 M) em 500 mL de solução aquosa de $CaOH_2$ (0,5 M), sob agitação constante à temperatura ambiente. Após o término do gotejamento, a solução permaneceu em agitação por 6 horas. Em seguida, o precipitado foi filtrado a vácuo utilizando papel de filtro (Qualy, 14 μm). O material foi lavado com água destilada e seco à temperatura de 100°C (Estufa de Secagem e Esterilização 315SE, Fanem, Brasil) por 24 horas. O sólido seco foi desaglomerado em almofariz de ágata e peneirado usando malha 80. O pó resultante foi calcinado à temperatura de 800°C (Mufla 7000, EDG 3PS, Brasil), por 3 horas, a uma taxa de aquecimento de 15°C/min e resfriado à temperatura ambiente.

4.4.2 Preparo do pó de hidroxiapatita contendo própolis (Atomização)

Os extratos de própolis foram incorporados ao pó de HA utilizando a técnica de atomização (*spray dryer* LM MSD 1.0, Labmaq, Brasil).

Os atomizadores ou *spray dryers* são equipamentos onde a secagem ocorre através de processo contínuo de pulverização, transformando o líquido em produto seco, apresentando como vantagem o baixo tempo de secagem, utilizando altas temperaturas sem afetar o produto final. A atomização ocorre quando o líquido é submetido a alta pressão por bombas ou ar comprimido, passando por bicos atomizadores, sendo pulverizado na câmara de secagem. O líquido pulverizado entra no compartimento que recebe o fluxo de ar quente, evaporando o solvente rapidamente. A velocidade com que a evaporação ocorre permite que as partículas permaneçam em temperaturas mais baixas, não afetando o produto final (GAVA, 1978).

Considerando os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos para os extratos de própolis, foram selecionados os EEP verde e vermelha para adição no biomaterial. Desta forma, a HA foi incorporada aos EEP verde (GP) e vermelha (RP) na proporção de 10% (m/v), em soluções de extrato com concentrações iguais a 20 mg/mL e 8 mg/mL, obtendo-se assim, HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8. A mistura foi realizada em agitador magnético e, imediatamente bombeada para o equipamento com fluxo de alimentação de 10 mL/min. A atomização foi realizada em bico atomizador de 1,2 mm e vazão de ar comprimido de 40 L/min. A secagem do material ocorreu em corrente de ar com velocidade de 2,5 m/s e temperaturas de 90 °C e 70 °C na entrada e saída do secador, respectivamente. Uma amostra

de HA (branco) foi preparada nas mesmas condições citadas, utilizando etanol 80% (v/v), produzindo assim, HA-ETOH80. As amostras foram preparadas em triplicata.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

4.5.1 Difração de raios X (DRX)

A caracterização dos materiais, utilizando a técnica de DRX, foi realizada pela metodologia descrita por Fielding et al. (2012), com modificações. A difração de raios X possibilita identificar fases cristalinas e amorfas, sendo uma das técnicas de caracterização de materiais mais utilizadas na área dos biomateriais. Os raios X são um tipo de radiação eletromagnética da mesma natureza que a luz visível, porém com comprimento de ondas muito menores, na faixa de Angstroms ($\text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$). Os raios são produzidos dentro de um tubo de raios catódicos, acelerados por alta voltagem. Desta forma, o elétron de alta energia gerado no cátodo colide com um alvo metálico (ânodo). A difração ocorre quando um feixe de ondas colide com um material cujos planos atômicos estejam arranjados periodicamente no espaço, com o mesmo comprimento de onda da radiação incidente, em condições geométricas que satisfaçam a Lei de Bragg (CALLISTER, 2006). A técnica microestrutural de DRX permite identificar o plano de cristalinidade característico de diversos materiais, consistindo na incidência e penetração dos raios X na rede cristalina, gerando interações com os elétrons e difrações que permitem identificar a estrutura cristalina, bem como a presença de fases e parâmetros de rede (GOBBO, 2009).

Os EEP verde e vermelha foram secos à temperatura de 50°C (Estufa de Secagem e Esterilização 315SE, Fanem, Brasil) até massa constante. Após, o material seco foi raspado para obtenção de um pó fino. A identificação da fase e cristalinidade dos extratos secos e dos materiais (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20, HA-RP8 e HA-ETOH80) foi realizada utilizando radiação Cu-K α ($\lambda=1,5406 \text{ \AA}$) com tensão de 40 KV e corrente de 15 mA. A varredura angular (2θ) foi de 10° a 50° com varredura de 2° por minuto (Difratômetro Miniflex 600, Rigaku, Japão). Os difratogramas para os EEP secos foram analisados por comparação com dados disponíveis na literatura. Os materiais HA contendo própolis foram analisados utilizando ficha padrão de difração para hidroxiapatita JPCDS 9-432 (em Anexo).

4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização dos materiais utilizando a técnica de MEV foi realizada pela metodologia descrita por Sneha e Sundaram (2015), com modificações. O princípio do método consiste na geração de elétrons a partir de um filamento de tungstênio, através de aplicação de uma corrente elétrica que ocorre dentro de uma coluna de alto vácuo. Esses elétrons são acelerados por uma diferença de potencial entre cátodo e ânodo, sendo colimados por um conjunto de lentes eletromagnéticas que agem como condensadores, reduzindo seu diâmetro. Assim, o feixe de elétrons passa por uma lente objetiva, realizando a varredura da amostra (MANNHEIMER, 2002). A superfície de seções polidas de amostras pode ser coberta por um condutor elétrico, normalmente carbono ou ouro. Entretanto, não são necessários ataques químicos para distinção das fases, que pode ser visualizada pela diferença de tons de cinza (GOBBO, 2009). A técnica fornece imagens com formatos tridimensionais de superfícies polidas ou rugosas, com grande profundidade e alta resolução, sendo de fácil interpretação. Possibilita, ainda, a manipulação e processamento das imagens (FONSECA, 2007). A amostra bombardeada pode, também, ser analisada por um detector para emissão de raios X, chamado espectrômetro de energia dispersiva (EDS), fornecendo a composição química elementar de um ponto ou região da superfície da amostra (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006).

A análise morfológica dos EEP secos e dos materiais (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20, HA-RP8 e HA-ETOH80) foi realizada com o equipamento operando a uma tensão de aceleração de 15 KV e magnitude de 1000 x (Microscópio eletrônico de varredura TM 3000, HITACH, Japão). As imagens foram registradas pelo próprio equipamento.

4.5.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização dos materiais utilizando a técnica de FTIR foi realizada pela metodologia descrita por Chen et al. (2011), com modificações. A técnica de FTIR é utilizada para detecção de grupos funcionais, bem como para a determinação da composição de uma amostra. O princípio do método é baseado na frequência de vibração específica das ligações químicas que correspondem a níveis de energia para cada molécula. Quando a radiação infravermelha incidente é absorvida pela molécula, converte-se em energia de vibração molecular gerando uma série de bandas. Para que a vibração seja detectada pelo

espectrofotômetro, é necessário que ocorra uma variação no momento dipolar da molécula. Os espectros de absorção no FTIR são obtidos através da intensidade da luz transmitida (ou absorvida) em função do comprimento de onda (ou número de onda) (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

A metodologia utilizada foi a transmissão direta, utilizando pastilha de KBr. Tanto os extratos secos, como materiais (HA-GP8, HA-GP20, HA-RP8, HA-RP20 e HA-ETOH80) foram misturados com KBr na proporção de 0,5% (m/m), utilizando almofariz de ágata. Após a mistura, o material foi prensado uniaxialmente (4,5 ton./5min.) para obtenção das pastilhas. Os materiais foram analisados em faixa de frequência de 4.000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} e um total de 32 acumulações (Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier Spectrun One, Perkin Elmer, USA). Os dados foram coletados em *software* Spectrun One (versão 5.3) e plotados utilizando *software* OriginPro8. Os resultados foram analisados por comparação com dados disponíveis na literatura.

4.6 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE PRÓPOLIS AO LONGO DO TEMPO

Foram realizados ensaios para verificar a liberação de própolis incorporada aos materiais, ao longo do tempo. Tanto o ensaio de liberação como os ensaios microbiológico e citotóxico foram realizados nas mesmas condições, ou seja, utilizando a mesma relação massa/volume (2%).

4.6.1 Ensaio de liberação

O ensaio foi realizado para todas as amostras contendo própolis (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20, HA-RP8) e para o branco (HA-ETOH80). Foi adicionado tampão TSB (0,5 g/L de NaCl e 2,5 g/L de K_2HPO_4) em tubo cônico de 50 ml contendo o material na proporção de 2% (m/v). Em seguida, o material foi submetido a homogeneização vigorosa, utilizando agitador tipo *vortex* por 20 segundos e, imediatamente, coletado 1 ml da mistura (tempo zero). Após a coleta, a mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 5 minutos (Microcentrifuga CT 14000, Cientec, Brasil) e o sobrenadante reservado a -20 °C para análises posteriores. O tubo contendo a mistura foi incubado a 37°C sob agitação de 150 rpm (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil) e realizadas novas coletas nos tempos 1/2, 1, 2, 4 e 9 horas. Para cada tempo de coleta, o material foi submetido a homogeneização vigorosa e repetidos os mesmos procedimentos realizados para o tempo zero.

Após, foi realizado ensaio para determinação da massa seca referente às liberações das amostras e do branco. Uma alíquota (1 ml), referente a cada liberação, foi seco à temperatura de 110°C em estufa (Estufa de Secagem e Esterilização 315SE, Fanem, Brasil). A pesagem foi realizada em balança analítica com precisão de 0,01 mg (Balança Analytical Plus AP250D, Ohaus, USA).

4.6.2 Análise Espectrofotométrica

A análise em espectrofotômetro foi realizada com o objetivo de verificar a liberação máxima de própolis ao longo do tempo, além de comparar os picos de absorção apresentados pelas liberações com os picos apresentados pelos EEP vermelha e verde.

As amostras foram submetidas às diluições de 1:150 (HA-GP20, HA-GP8), 1:25 (HA-RP20, HA-RP8), e 1:10⁴ (EEP verde e vermelha), a fim de obter valores de absorbância inferiores a 1,0. O ensaio foi realizado utilizando o equipamento no modo *scan* (Espectrofotômetro DU 800, Beckman Coulter, USA), em comprimento de onda de 250 a 700 nm).

4.6.3 Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais

A quantidade de fenólicos e flavonoides totais presentes nas soluções, após o ensaio de liberação, foram determinadas conforme metodologia descrita nos itens 4.2.1 e 4.2.2. As amostras obtidas nas liberações foram submetidas às diluições de 1:15 (HA-GP20), 1:8 (HA-GP8), 1:3 (HA-RP20) e 1:2 (HA-RP8), para determinação do conteúdo de fenólicos totais. Para a determinação de flavonoides totais, todas as amostras foram utilizadas sem diluição. Para ambos os ensaios, foi utilizado como branco a mistura reacional contendo tampão TSB. Os resultados foram expressos em EAG em mg/g de ES e EQ em mg/g de ES para fenólicos e flavonoides totais, respectivamente. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada amostra.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MATERIAIS

4.7.1 Contagem de colônias bacterianas em placas

A contagem de colônias bacterianas viáveis, após o contato com os materiais, ao longo do tempo, foi realizada pela metodologia descrita por Stanic et al. (2015), com modificações. Os microrganismos foram reativados e a suspensão bacteriana ajustada para concentração de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL em meio TSB, conforme descrito no item 4.3.1.

O ensaio foi realizado para as amostras (HA-GP20, HA-GP08, HA-RP20 e HA-RP08), com adição de meio TSB (4950 ml) em tubo cônico de 50 ml contendo o material (100 mg). Em seguida, foi adicionado 50 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) de modo a obter concentração final igual a 10^5 UFC/mL. Após a adição do microrganismo, o material foi submetido a homogeneização vigorosa por 20 segundos, utilizando agitador tipo *vortex* e, imediatamente, coletado uma alíquota para realização das diluições apropriadas (10 , 10^2 , 10^3). Em seguida, uma alíquota (100 µL) de todas as diluições foram semeadas em placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio ágar (MH) (tempo zero). Os tubos contendo as amostras foram incubados a 37 °C sob agitação (150 rpm) (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil) e realizadas novas coletas nos tempos 1/2, 1, 2 e 4 horas. Para cada tempo, os tubos foram submetidos a homogeneização vigorosa e repetidos os mesmos procedimentos realizados para o tempo zero. Foram utilizados dois controles: 1) contendo HA-ETOH80; 2) contendo apenas meio TSB e bactéria (crescimento bacteriano).

A porcentagem da redução bacteriana (%R), em cada tempo, foi calculada através da eq.(2)

$$\%R = [(C_0 - C) / C_0] \times 100 \quad (2)$$

Onde, C_0 representa a média do número de UFC da amostra HA-ETOH80 e C representa a média do número de UFC das amostras HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8. O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra.

4.7.2 Determinação da CIM e CBM para os materiais

Os microrganismos foram reativados e a suspensão bacteriana ajustada para concentração de 1×10^8 UFC/mL em meio TSB, conforme descrito no item 4.3.1. Em seguida, a suspensão bacteriana foi diluída em meio TSB para concentração final igual a 1×10^7 UFC/mL.

Os materiais (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20, HA-RP8 e HA-ETOH80) foram tratados em meio TSB na proporção de 2% (m/v) e incubados a 37 °C sob agitação (150 rpm) (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil), por um período de 04 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos (Centrífuga CT 5000, Cientec, Brasil). O sobrenadante proveniente das amostras (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20, HA-RP8) foram submetidos a diluições seriadas utilizando meio TSB (volume final igual a 4950 µL). Após as diluições, foi adicionado 50 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) de modo a obter concentração final igual a 10^5 UFC/mL. Foram realizados quatro controles: 1) com adição de 4950 µL do sobrenadante de HA-ETOH80 e 50 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) (controle negativo); 2) com a adição de 4900 µL de meio TSB, 50 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) e 50 µL de gentamicina a 2,5 mg/mL (controle positivo); 3) com adição de 4950 µL de meio TSB e 50 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) (crescimento bacteriano); 4) com adição de 4950 µL de meio TSB e 50 µL de PBS (branco). Em seguida, o material foi incubado a 37°C, por 24 horas, sob agitação de 150 rpm (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil). Após a incubação, foi realizada leitura das absorbâncias em leitor de microplacas a 620 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA), utilizando placas de 96 poços (300 µL das amostras e controles em cada poço). A CIM foi considerada a menor faixa de concentração onde não houve crescimento bacteriano visível (absorbância menor 0,05). Para melhor visualização na placa, foi adicionado 5 µL do corante resazurina (3 mg/mL), onde a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano enquanto a coloração rosa indica a presença de bactérias viáveis.

A determinação da CBM foi realizada conforme descrito no item 4.3.3. O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra.

4.8 AVALIAÇÃO *IN VITRO* UTILIZANDO CULTURA DE CÉLULAS

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é um teste de biocompatibilidade que utiliza culturas de células para avaliar materiais utilizados como dispositivos biomédicos. A metodologia consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com as células e analisar as possíveis alterações celulares, utilizando diferentes mecanismos. A viabilidade celular, um dos modelos mais difundidos para avaliar a toxicidade do material, pode ser determinada pela adição de corantes, como o vermelho neutro. A solução de vermelho neutro (catiônico) é capaz de atravessar a membrana celular e se fixar na matriz lisossomal

(aniônica), através de ligações eletrostáticas. Quando a célula é danificada, há uma diminuição na captura com consequente diminuição de ligação do vermelho neutro, sendo possível diferenciar células vivas ou danificadas/mortas, pela intensidade da cor da cultura celular (CIAPETTI et al., 1996; ROGERO et al., 2003).

Considerando os resultados obtidos nas análises microbiológicas dos materiais, o ensaio para determinação da viabilidade celular foi realizado apenas para as amostras contendo a menor quantidade de própolis (HA-GP8, HA-RP8). Todos os materiais utilizados no ensaio foram esterilizados por via úmida, utilizando autoclave à temperatura de 120°C e pressão de 1 Kgf/cm², durante 20 minutos. O meio de cultura suplementado (MCS) foi esterilizado utilizando membrana estéril de porosidade de 0,22 µm e as amostras (HA-GP8, HA-RP8 e HA-ETOH80) e controle negativo (alumina) foram esterilizadas sob radiação UV por 1 hora.

4.8.1 Cultura de células

O ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Zhang et al. (2011), com modificações, utilizando linhagem celular CHO-k1, células de ovário de Hamster chinês. O cultivo celular foi realizado em placa de 150 mm de diâmetro, utilizando meio de cultura RPMI medium 1640 (GIBCO), suplementado com penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), anfotericina B (0,025 µg/mL), glutamina (2 mM) e soro fetal bovino (10%), a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%), por 72 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA). Para garantir um crescimento celular satisfatório, foram realizadas trocas do MCS nos períodos de 24 e 48 hs. Após 72 horas, o meio suplementado foi retirado e as células removidas utilizando solução de tripsina (Tryple Express com vermelho de fenol Gibco 12605).

A contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer por diluição em azul de trypan 0,4% (1:5) (Microscópio óptico 8060A, BEL, Itália). O método é baseado na observação de células viáveis, impermeáveis ao corante, enquanto as células não viáveis permitem a penetração do corante devido a formação de poros na membrana, exibindo a coloração azul (KONOPKA et al., 1996).

4.8.2 Viabilidade celular - método de incorporação do vermelho neutro (VN)

Os materiais foram preparados conforme norma ISO 10993-12 (2004). As amostras HA-GP8, HA-RP8, HA-ETOH80 e alumina foram adicionadas em criotubo e misturadas ao MCS na proporção 2% (m/v). Em seguida, os tratamentos foram incubados a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%), por 24 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA). Após esse período, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 13000 rpm por 5 minutos (Microcentrifuga CT 14000, Cientec, Brasil) e o sobrenadante reservado para o ensaio. Foram utilizados três controles: 1) Alumina (controle negativo); 2) solução de fenol 0,2% (controle positivo); 3) MCS (branco). Após as 24 horas, tanto as amostras como os controles foram submetidos a diluições seriadas, obtendo-se as concentrações 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%.

O ensaio de citotoxicidade utilizado foi o método indireto de incorporação do vermelho neutro, conforme norma ISO 10993-5 (2009). As células (1×10^4 células/poço) foram cultivadas em MCS (200 µL) e incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA), por 24 horas, utilizando placa de 96 poços. Após esse período, o MCS foi retirado e os tratamentos (amostras e controles) e suas respectivas diluições (200 µL) foram adicionados na placa contendo as células. A placa contendo os tratamentos foi novamente incubada a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) por 24 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA). Após o tratamento, foi observada a morfologia celular (Microscópio óptico invertido PRIMO, CARL ZEISS, Alemanha) e o meio contendo os tratamentos foi retirado dos poços. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (200 µL). Após a retirada do PBS, adicionou-se 200 µL da solução de vermelho neutro (50 µg/mL) e a placa foi incubada a 37°C em atmosfera de CO₂ (5%) por 3 horas (Estufa incubadora CCL-170B-8, ESCO, USA), para incorporação do VN. Em seguida, a solução de VN foi retirada e os poços lavados com 200 µL de PBS. Após a retirada do PBS, foram adicionados 200 µL de solução de extração (50% Etanol: 1% Ácido acético: 49% Água destilada) e a placa submetida à agitação de 150 rpm por 10 minutos (Shaker TE-420, Tecnal, Brasil), para extração do VN das células. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas a 540 nm (Multiskan FC, Thermo Scientific, USA). Os resultados foram expressos em viabilidade celular (%VC), calculada conforme eq.(3).

$$\%VC = (\text{Abs amostra} / \text{Abs branco}) \times 100 \quad (3)$$

Onde *Abs amostra* é a absorbância da amostra a 540 nm e *Abs branco* é a absorbância do branco a 540 nm. O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão para três experimentos independentes ($n = 3$). Foram realizadas análises de variância (ANOVA), teste-t ou teste de Tukey para comparação das médias, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) (Minitab Inc., EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

A caracterização dos extratos foi realizada pela determinação da quantidade de fenólicos totais, expresso em miligramas de equivalente em ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco (ES) e pela quantidade de flavonoides totais, expressa em miligramas de equivalente em quercetina (EQ) por grama de ES. Os valores indicam que aproximadamente 31,7%, 32,6% e 27,8% dos EEP são constituídos de fenólicos totais para própolis vermelha, verde e marrom, respectivamente. Para flavonoides totais, os valores encontrados foram aproximadamente 11,2%, 5,2% e 4,8% para os EEP vermelha, verde e marrom, respectivamente. Os resultados para fenólicos totais não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Por outro lado, os valores para flavonoides totais variaram significativamente ($p < 0,05$), sendo que o EEP vermelha apresentou maior quantidade (112,4 mg EQ/g ES) comparado aos outros extratos analisados no presente estudo. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Quantidade de fenólicos e flavonoides totais para os extratos de própolis.

Extratos	Fenólicos totais (mg EAG/g MS)	Flavonoides totais (mg EQ/g MS)
EEP vermelha	317,4 ± 9,0 ^a	112,4 ± 7,6 ^A
EEP verde	325,6 ± 48,7 ^a	52,3 ± 1,2 ^B
EEP marrom	278,3 ± 35,9 ^a	48,4 ± 4,2 ^B

Média ± desvio padrão (n = 3); Letras diferentes maiúsculas e minúsculas na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Diversos autores utilizam solução hidroalcoólica para extração de fenólicos e flavonoides totais em própolis. Machado B. A. S. et al. (2016) avaliaram extratos de própolis vermelha, verde e marrom de diferentes regiões do Brasil, obtidas por extração supercrítica (CO₂) e extração em etanol. Os valores encontrados variam de 97,97 a 300,36 mg EAG/g ES para fenólicos totais e de 11,55 a 57,60 mg EQ/g ES para flavonoides totais, sendo os melhores resultados observados para extração em etanol e para própolis vermelha. Araújo et al. (2016) obtiveram extratos etanólicos de diferentes tipos de própolis do Tocantins, estado brasileiro, e reportaram valores entre 121,78 e 631,29 mg EAG/g ES para fenólicos totais.

Extratos etanólicos de própolis verde e marrom, de origem brasileira, produzidos por Bittencourt et al. (2015), apresentaram quantidades de fenólicos totais de 185,52 e 48,24 mg EAG/g ES, respectivamente. Valenzuela-Barra et al. (2015) avaliaram EEP de origem Chilena e observaram quantidades de fenólicos e flavonoides totais igual a 24,3% e 3,1%, respectivamente, valores bem próximos aos encontrados para EEP marrom do presente estudo. Schmidt et al. (2014b) produziram EEP do Paraná, estado brasileiro, utilizando diferentes condições de extração e relataram valores para fenólicos totais variando de 147,5 a 231 mg EAG/g ES e flavonoides totais variando de 7,9 a 11,7 mg EQ/g ES. Mello e Hubinger (2012) obtiveram EEP de São Paulo, sendo observado resultados para o conteúdo de fenólicos totais entre 49,80 e 100,60 mg EAG/g ES, enquanto o conteúdo de flavonoides totais variou de 64,91 a 68,30 mg EQ/g ES. Alencar et al. (2007) produziram EEP vermelha de Alagoas, estado brasileiro, e os resultados apresentados foram de 232 mg EAG/g ES e 43 mg EQ/g ES para fenólicos e flavonoides totais, respectivamente.

Os compostos químicos, encontrados na própolis, têm origem em três principais fontes: seiva da planta coletada pelas abelhas, substâncias secretadas pelo metabolismo das abelhas e cera, sendo sua composição química altamente variável devido, principalmente, às condições fitogeográficas. A própolis produzida em regiões temperadas, por exemplo, apresenta em sua composição, principalmente, compostos fenólicos: flavonoides, agliconas, ácidos aromáticos e seus ésteres. A própolis verde, de origem brasileira, apresenta em sua composição, derivados do ácido *p*-cumárico prenilado (artepillin C), ácidos diterpênicos, acetofenonas preniladas e flavonoides, enquanto a própolis vermelha, originária do Brasil, apresenta como principal característica química a presença de isoflavonas. Além disso, a própolis produzida nas diferentes regiões do Brasil apresenta uma variação significativa em sua composição química, sendo que treze tipos de própolis já foram caracterizadas em função de sua localização geográfica e espécies de plantas presentes na região (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; FROZZA et al., 2013; HAUSEN et al., 1987; SFORCIN; BANKOVA, 2011). Portanto, este contexto deve ser considerado na comparação com os resultados reportados em outros estudos. As variações nas quantidades observadas pelos autores para o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais, comparado ao presente estudo, pode estar relacionada às condições fitogeográficas das amostras.

A extração de compostos fenólicos e flavonoides totais, utilizada no presente trabalho, foi realizada com solvente etanol/água, sendo esta mistura a mais utilizada nos estudos envolvendo extratos de própolis (ZHENG et al., 2016). Os compostos fenólicos, em especial

os flavonoides, obtidos por extração etanol/água, têm sido responsáveis por diversas atividades farmacológicas (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001; SFORCIN, 2007). Estudos indicam que a utilização de etanol e água é capaz de "dissolver" os flavonoides presentes na própolis bruta, através de interações intermoleculares, destacando-se as ligações de hidrogênio. Zheng et al. (2016) investigaram as ligações de hidrogênio entre etanol/água e flavonoides, utilizando crisina e galangina como padrões. Foi verificada a formação de complexos crisina-etanol/água e galangina-etanol/água. O estudo também concluiu que os átomos de hidrogênio (exceto alguns aromáticos) e todos os átomos de oxigênio podem formar ligações de hidrogênio com etanol e água. Além disso, etanol e água formam fortes ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila, carbonila e éter e fracas ligações com hidrogênios aromáticos presentes em crisina e galangina.

Portanto, os resultados encontrados para o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais do presente trabalho mostram que a extração utilizando solvente hidroalcoólico foi eficiente. As variações nas quantidades observadas pelos autores, em comparação com o presente estudo, podem estar relacionadas tanto às condições fitogeográficas como as diferenças nas condições de extração. No presente estudo, após o resfriamento e filtração, o extrato foi novamente resfriado e centrifugado, com o objetivo de eliminar substâncias insolúveis como resina e cera.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS

A atividade antimicrobiana dos EEP vermelha, verde e marrom foi verificada frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram realizados os testes de difusão em ágar e determinação da concentração inibitória e bactericida mínima.

5.2.1 Teste de difusão em ágar

Através do teste de difusão em ágar, foi avaliada, de forma qualitativa, a atividade antimicrobiana dos EEP vermelha, verde e marrom frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Os extratos foram analisados em concentrações seriadas (200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 mg/mL), utilizando etanol 80% (v/v) como controle negativo e gentamicina (20 µg/mL) como controle positivo. As Figuras 7, 8 e 9 ilustram as zonas de

inibição do crescimento bacteriano para os extratos, controle positivo e controle negativo, frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, respectivamente. Os resultados mostram que todos os EEP apresentaram atividade inibitória frente às bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* (Figuras 7 e 8). Por outro lado, não foi observado inibição do crescimento bacteriano frente à bactéria *E. coli* (Figura 9). É possível observar, ainda, que em concentrações menores, abaixo de 3,12 mg/mL para EEP verde e 6,25 mg/mL para EEP marrom, não houve inibição do crescimento para *S. aureus* (Figura 7). Da mesma forma, os EEP verde e marrom não apresentaram inibição para *S. epidermidis* abaixo de 6,25 mg/mL e 12,5 mg/mL, respectivamente (Figura 8). Os resultados observados sugerem que, em menores concentrações (até 0,78 mg/mL), o EEP vermelha apresenta maior atividade frente às bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis*, comparado aos outros EEP avaliados neste trabalho.

Ainda, é possível verificar halos de inibição do crescimento bacteriano para *S. aureus* variando entre 12,88 mm e 21,72 mm (EEP vermelha), 14,75 mm e 22,25 mm (EEP verde) e 16,05 mm e 20,22 mm (EEP marrom). Para *S. epidermidis* observa-se variação dos halos de inibição entre 12,02 mm e 20,62 mm (EEP vermelha), 12,21 mm e 19,45 mm (EEP verde) e 12,08 mm e 19,28 mm (EEP marrom). Os valores dos halos de inibição do crescimento bacteriano, frente às bactérias *S. aureus* e *S. Epidermidis*, para as diferentes concentrações dos EEP, são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores das médias dos halos de inibição do crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Bactéria	EEP	Concentração dos EEP (mg/mL)								
		200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78
<i>S. aureus</i>	Va	21,72±0,20	20,42±0,36	20,39±0,16	19,27±0,33	18,65±0,49	18,02±0,16	16,45±0,35	16,7±0,42	12,88±0,18
	Ve	22,25±0,87	22,03±0,64	21,03±0,14	19,38±0,17	18,17±0,23	16,21±0,13	14,75±0,35	NO	NO
	M	20,22±0,17	20,35±0,98	20,45±0,07	20,05±0,35	17,53±0,32	16,05±0,36	NO	NO	NO
<i>S. epidermidis</i>	Va	20,62±0,28	19,75±0,85	18,55±0,48	18,47±0,37	15,96±0,62	15,51±0,54	15,47±0,55	14,77±0,32	12,02±0,11
	Ve	19,45±0,67	19,23±0,88	18,73±0,11	17,11±0,13	15,82±0,94	12,21±0,57	NO	NO	NO
	M	19,28±0,77	18,22±0,12	16,44±0,97	14,08±0,72	12,08±0,29	NO	NO	NO	NO

Va: EEP vermelha; Ve: EEP verde; M: EEP marrom; NO: não observado. Média ± desvio padrão (n = 3).
Fonte: Própria autoria.

Figura 7 - Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha (A), verde (B) e marrom (C) em concentrações de extrato variando de 200 a 0,78 mg/mL, frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Fonte: Própria autoria.

Figura 8 - Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha (A), verde (B) e marrom (C) em concentrações de extrato variando de 200 a 0,78 mg/mL, frente à *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Fonte: Própria autoria.

Figura 9 - Teste de difusão em ágar para os EEP vermelha (A), verde (B) e marrom (C) em concentrações de extrato variando de 200 a 0,78 mg/mL, frente à *Escherichia coli* ATCC 25922.

Fonte: Própria autoria.

Outros autores investigaram a ação antibacteriana de EEP através do teste de difusão em ágar. Kubiliene et al. (2015) estudaram a ação antimicrobiana de extratos de própolis da Lituânia obtidos com diferentes solventes. Os autores verificaram atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de própolis (10% m/v utilizando etanol 70%) tanto para *S. aureus* como para *E. coli*, reportando halos de inibição de 15,8 mm e 14,8 mm, respectivamente. Benhanifia et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de EEP (100 mg/mL) de diferentes regiões da Argélia frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Os autores observaram valores de 9 a 20 mm para os halos de inibição frente à bactéria *S. aureus*, entretanto, não foi verificada atividade dos extratos frente à *E. coli*. Em outro estudo, Victorino et al. (2009) obtiveram formulações para tratamento ortodôntico a base de própolis e verificaram atividade antimicrobiana frente à *S. aureu*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Os valores obtidos para as médias dos halos de inibição foram de 20,3 mm, 20,0 mm e 13,0 mm, respectivamente.

Apesar dos valores encontrados neste ensaio serem satisfatórios, o teste de difusão em ágar é uma análise qualitativa, realizada de forma preliminar. Desta forma, outras análises foram realizadas com o objetivo de melhor investigar a atividade antimicrobiana dos EEP.

5.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM)

O ensaio para determinação da CIM foi realizado para todos os EEP, em concentrações seriadas variando de 1600 a 12,5 µg/mL (EEP verde e marrom) e de 1600 a 0,78 µg/mL (EEP vermelha). Após a incubação dos EEP contendo as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*, foram realizadas leituras de absorbância a 620 nm, utilizando placas de 96 poços, considerando como concentração inibitória mínima a menor concentração do extrato que apresente leitura de absorbância inferior a 0,05. Para melhor visualização, adicionou-se o corante resazurina nos poços contendo as amostras, controle negativo (etanol 80%), controle positivo (gentamicina 20 µg/ml) e crescimento bacteriano. A coloração amarelo/rosa representa o crescimento bacteriano, enquanto a coloração azul indica a inibição do crescimento bacteriano, como ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Determinação da CIM, utilizando corante resazurina, na presença de: Branco (A1 e A2), crescimento bacteriano (B1 e B2), controle positivo (C1 e C2), controle negativo (D1 e D2), EEP marrom (colunas 3 e 4), EEP verde (colunas 5 e 6), EEP vermelha (colunas 7, 8, 9 e 10) em concentrações seriadas variando de 1600 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$ para os EEP marrom e verde, e de 1600 a 0,78 $\mu\text{g/mL}$ para o EEP vermelha. São exibidas as placas para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (B) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (C).

Fonte: Própria autoria.

Os resultados dos ensaios para determinação da CIM, utilizando os EEP em concentrações decrescentes a partir da linha A, estão representados pelas colunas 3 e 4 (EEP marrom), 5 e 6 (EEP verde), 7, 8, 9 e 10 (EEP vermelha), como ilustrado na Figura 10. Para os ensaios realizados frente às bactérias *S. aureus* (Figura 10A) e *S. epidermidis* (Figura 10B), foi possível verificar a inibição do crescimento bacteriano para todos os extratos utilizados. Para a bactéria *S. aureus* (Figura 10A), observou-se valores para CIM de 200 µg/mL (D3 e D4), 100 µg/mL (E5 e E6) e 12,5 µg/mL (H7 e H8) para EEP marrom, verde e vermelha, respectivamente. Para o ensaio realizado frente à *S. epidermidis* (Figura 10B), os resultados obtidos para CIM foram de 200 µg/mL (D3 e D4), 200 µg/mL (D5 e D6) e 12,5 µg/mL (H7 e H8) para EEP marrom, verde e vermelha, respectivamente. Por outro lado, não foi observado inibição do crescimento bacteriano frente à bactéria *E. coli* (Figura 7C). É possível observar, ainda, que em todos os ensaios realizados com as bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* (Figura 10 A, B e C), os poços contendo o branco (A1 e A2) e o controle positivo (C1 e C2) não apresentaram crescimento bacteriano, enquanto nos poços contendo o inóculo com PBS (B1 e B2) e controle negativo (D1 e D2), foi verificado o crescimento bacteriano.

Outros estudos indicam maior eficiência dos extratos de própolis frente às bactérias Gram-positivas quando comparado às bactérias Gram-negativas (SFORCIN et al., 2000; SCHMIDT et al., 2014a). A atividade frente às bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e ausência de atividade frente à Gram-negativa (*E. coli*), verificada no presente trabalho, pode ser explicado pelas diferenças na parede celular entre os dois tipos de bactérias. A presença de lipopolissacarídeos na parede celular das bactérias Gram-negativas auxilia na proteção destes microrganismos, impedindo a entrada de compostos químicos, potencialmente antibacterianos, presentes na própolis. Além disso, estes compostos químicos poderiam ser inativados por enzimas hidrofílicas liberadas pelas bactérias Gram-negativas (MIRZOEVA; GRISHANIN; CALDER, 1997).

A partir dos resultados obtidos para CIM, foram determinadas as CBM para todos os EEP frente à *S. aureus* e *S. epidermidis*, uma vez que os resultados apresentados não demonstraram inibição do crescimento bacteriano frente à *E. coli*. Desta forma, a CBM foi determinada pela observação do crescimento bacteriano em placa para os microrganismos incubados com os extratos em concentrações superiores a CIM. A Figura 11 ilustra os resultados para CBM frente à bactéria *S. aureus*, enquanto a Figura 12 mostra os resultados obtidos para CBM frente à *S. epidermidis*. É possível observar valores para CBM de 1600

$\mu\text{g/mL}$ para o EEP marrom (Figuras 11A e 12A), 800 $\mu\text{g/mL}$ para os EEP verde (Figuras 11B e 12B) e 800 $\mu\text{g/mL}$ vermelha (Figuras 11C e 12C), para ambas as bactérias testadas.

Figura 11 - Determinação da CBM para os EEP frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. São exibidas as imagens para EEP marrom (A), EEP verde (B) e EEP vermelha (C).

Fonte: Própria autoria.

Figura 12 - Determinação da CBM para os EEP frente à bactéria *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. São exibidas as imagens para EEP marrom (A), EEP verde (B) e EEP vermelha (C).

Fonte: Própria autoria.

Os resultados para CIM e CBM, utilizando os EEP marrom, verde e vermelha, frente às bactérias *S. aureus* e *S. epidermidis* são mostrados na Tabela 6. É possível verificar que o EEP vermelha apresentou maior atividade inibitória (12,5 $\mu\text{g/mL}$) frente às duas bactérias, comparado aos outros extratos avaliados no presente estudo. Os resultados ainda mostram maior atividade inibitória para EEP verde (100 $\mu\text{g/mL}$) frente à *S. aureus*, comparado ao EEP marrom (200 $\mu\text{g/mL}$). Ainda, é possível observar maior atividade bactericida para os EEP

vermelha e verde (800 µg/mL), frente à *S. aureus* e *S. epidermidis*, comparado ao EEP marrom (1600 µg/mL).

Tabela 6 - Valores para CIM e CBM utilizando os EEP contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

EEP	Bactéria	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Marrom		> 200	> 1600
Verde	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 100	> 800
Vermelha		> 12,5	> 800
Marrom		> 200	> 1600
Verde	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 200	> 800
Vermelha		> 12,5	> 800

Fonte: Própria autoria.

A maior atividade antibacteriana verificada para própolis vermelha tem sido atribuída a sua composição química, principalmente pela presença de flavonoides, destacando-se as isoflavonas como daidzeína, formononetina e biochanina A (ALENCAR et al., 2007; FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; OLDONI et al., 2011). Assim, os resultados apresentados neste trabalho indicam que a maior atividade inibitória apresentada pelo EEP vermelha, frente à *S. aureus* e *S. epidermidis*, estaria relacionada a maior quantidade de flavonoides totais presente neste extrato. Assim como mostrado neste estudo, outros autores já reportaram a maior atividade antibacteriana para EEP vermelha, comparado aos EEP verde e marrom. Machado B. A. S. et al. (2016) avaliaram a atividade antibacteriana de EEP vermelha, verde e marrom de diferentes regiões do Brasil, frente à *S. aureus* e *E. coli*. Foi verificada maior atividade inibitória e bactericida para os EEP vermelha, sendo este resultado atribuído à maior quantidade de fenólicos e flavonoides totais presentes nesta amostra. Ainda, no mesmo estudo, os autores verificaram maior atividade antibacteriana para EEP verde, comparado ao EEP marrom. Grenho et al. (2015) avaliaram atividade antibacteriana de nanohidroxiapatita contendo própolis vermelha e verde, frente à *S. aureus*. Os autores verificaram que, nas mesmas concentrações, o material contendo própolis vermelha foi mais eficiente na redução do crescimento bacteriano. A maior atividade antibacteriana para própolis vermelha, comparada à própolis verde, foi atribuída às diferenças na composição química dos extratos, destacando-se a presença de ácido cinâmico e crisina presentes na própolis vermelha.

Diversos estudos demonstram a atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos de própolis frente às mesmas bactérias utilizadas no presente estudo. Lopez et al. (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de EEP vermelha de origem brasileira e Cubana, frente à *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*. Os autores observaram valores para CIM de 25 µg/mL frente à *S. aureus* e *S. epidermidis* e 200 µg/mL frente à *E. coli*. Campos et al. (2015) obtiveram EEP de origem brasileira e observaram valores para CIM e CBM de 550 µg/mL e 1500 µg/mL frente à *S. aureus* e valores de 880 µg/mL e 1920 µg/mL frente à *S. epidermidis*. Schmidt et al. (2014a) obtiveram EEP de origem brasileira e demonstraram valores médios para CIM e CBM de 650 µg/mL e 1015 µg/mL frente à *S. aureus*. Entretanto, não foi observada atividade frente à *E. coli*. Wojtyczka et al. (2013) demonstraram a atividade inibitória de EEP da Polônia, frente à *S. epidermidis*, relatando valores para CIM de 780 µg/mL. Outros autores demonstraram a atividade antibacteriana de EEP de origem brasileira frente à *S. aureus*. Castro et al. (2009) observaram valores para CIM e CBM de 25 e 400 µg/mL, respectivamente, enquanto Alencar et al. (2007), utilizando extratos de própolis vermelha, observaram valores de 50 e 200 µg/mL para CIM e CBM, respectivamente.

Estudos anteriores demonstram que a propriedade antibacteriana apresentada pelos diversos tipos de própolis é atribuída, principalmente, à presença de fenólicos e flavonoides totais (KOO et al., 2000; SAWAYA et al., 2004; DARWISH et al., 2010). Outros estudos já demonstraram a ação antimicrobiana de isoflavonoides isolados de extratos hidroalcoólicos de própolis vermelha, como vestitol, neovestitol e isoliquiritigenina (OLDONI et al., 2011; BUENO-SILVA et al., 2013). Além disso, têm sido observada correlação positiva entre a conteúdo de flavonoides totais e a atividade antibacteriana, frente às bactérias Gram-positivas (BONVEHI; GUTIERREZ, 2012; SULEMAN et al., 2015).

O mecanismo de ação da atividade antimicrobiana da própolis é bastante complexo, sendo atribuído a presença dos compostos fenólicos e, ainda, ao efeito sinérgico entre estes compostos (DARWISH et al., 2010). Nesse contexto, a ação antibacteriana dos compostos químicos presentes no extratos de própolis está ligada tanto aos aspectos funcionais como estruturais das bactérias, causando danos na membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, inibição do metabolismo energético e inibição da formação de biofilmes. Além disso, estes compostos ainda poderiam aumentar a permeabilidade da membrana e inibir a motilidade bacteriana, provocando lise e eventual morte celular. (BRYAN; REDDEN; TRABA, 2016; SFORCIN, 2016; XIE et al., 2015).

Portanto, os resultados observados neste trabalho e reportados em outros estudos mostram que os extratos obtidos para própolis vermelha, verde e marrom apresentam atividade antibacteriana. A diferença entre os valores reportados por outros autores, comparado ao presente trabalho, poderia estar relacionada às diferenças na metodologia de extração utilizada e às características fitogeográficas das amostras. Assim, os valores observados para CIM e CBM confirmam os testes prévios, utilizando a metodologia de difusão em ágar, demonstrando a atividade antibacteriana destes extratos frente às bactérias Gram-positivas. Os resultados ainda indicam maior eficiência para própolis vermelha, sugerindo que esta atividade estaria relacionada à maior quantidade de flavonoides presentes neste extrato.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS

Considerando os resultados obtidos nos ensaios anteriores, foram selecionados os extratos de própolis verde e vermelha para incorporação ao biomaterial hidroxiapatita. As amostras foram preparadas em proporção de 10% (m/v), utilizando os extratos de própolis verde (GP) e vermelha (RP) em concentrações distintas (20 mg/mL e 8 mg/mL), obtendo-se, assim, os materiais HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8. Foi preparado, também, uma amostra controle denominada HA-ETOH80, utilizando apenas etanol 80% (v/v).

As amostras de HA contendo própolis e os extratos secos de própolis verde e vermelha foram caracterizados utilizando a técnica de DRX. Os resultados para os extratos secos foram analisados por comparação com dados disponíveis na literatura, enquanto a amostra HA-ETOH80 foi analisada por comparação com os valores obtidos através de ficha padrão de difração para hidroxiapatita JPCDS 9-432 (em Anexo).

A Figura 13 ilustra os difratogramas para os extratos secos de própolis verde e vermelha. Os resultados demonstram estrutura amorfa para ambos os extratos secos, com picos largos em $19,5^\circ$ e $18,9^\circ$ para própolis verde e vermelha, respectivamente. Diversos autores já caracterizaram extrato seco de própolis e verificaram estrutura amorfa para o material (BARUD et al., 2013; DRAPAK et al., 2006; DRAPAK et al., 2008; ROCHA et al., 2012; YANG et al., 2014). Barud et al. (2013) caracterizaram extrato seco de própolis verde de origem brasileira e verificaram estrutura amorfa com picos largos em $17,0^\circ$. Yang et al. (2014) analisaram extrato seco de própolis brasileira e demonstraram estrutura amorfa com picos largos em $21,5^\circ$.

Figura 13 - Espectros de DRX para os extratos secos de própolis verde e vermelha.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados das análises de DRX para as amostras (HA-ETOH80, HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8) estão apresentados na Figura 14. Para a amostra HA-ETOH80, é possível identificar picos estreitos e definidos, característicos de material com estrutura cristalina. De acordo com a ficha JPCDS 9-432, a amostra (HA-ETOH80) apresenta estrutura hexagonal, com picos majoritários coincidindo com o padrão, indicando que o material sintetizado e submetido ao processo de *spray drying* é hidroxiapatita. Ainda, verifica-se que a adição de própolis verde e vermelha, em proporções distintas, não altera a estrutura cristalina da HA, nem apresenta a formação de novas fases.

Figura 14 - Espectros de DRX para as amostras HA-ETOH80, HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8.

Fonte: Própria autoria.

A morfologia dos extratos secos de própolis verde e vermelha, analisada por MEV, está ilustrada na Figura 15 A e B, respectivamente. As imagens mostram placas grandes de forma irregular, com superfície lisa e quebradiça, uma vez que ambos os EEP foram secos em placas de Petri e raspadas com auxílio de um bisturi.

Figura 15 - Imagens de MEV para os extratos secos de própolis verde (A) e vermelha (B).

Fonte: Própria autoria.

A Figura 16 mostra a morfologia para as amostras HA-ETOH80 (A), HA-GP20 (B) e HA-GP8 (C), enquanto a Figura 17 ilustra a morfologia para as amostras HA-ETOH80 (A), HA-RP20 (B) e HA-RP8 (C). O pó de HA-ETOH80 (Figuras 16 A e 17 A) mostra a presença de aglomerados e morfologia com partículas aparentemente pequenas, com formatos esféricos. Por outro lado, a mistura de própolis seca com HA, via processo de *spray drying*, tanto para própolis verde e vermelha, nas diferentes quantidades, mostra um pó com menor grau de aglomeração e partículas aparentemente esféricas. As imagens obtidas por MEV (Figuras 16 e 17) sugerem que a adição de própolis verde e vermelha na HA (*spray drying*), nas diferentes quantidades, provoca uma diminuição no grau de aglomeração das partículas.

Figura 16 - Imagens de MEV para as amostras HA-ETOH80 (A), HA-GP20 (B) e HA-GP8 (C).

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 - Imagens de MEV para as amostras HA-ETOH80 (A), HA-RP20 (B) e HA-RP8 (C).

Fonte: Própria autoria.

As análises de FTIR foram realizadas com o objetivo de identificar os grupos funcionais específicos tanto para os extratos secos de própolis verde e vermelha como para as amostras (HA-ETOH80, HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8). Para os extratos secos de própolis verde e vermelha, os espectros de FTIR foram obtidos com objetivo principal de identificar grupos funcionais característicos de fenólicos e flavonoides totais, principais responsáveis pela atividade antimicrobiana destes extratos, uma vez que a composição da própolis é bastante complexa e variável, apresentando mais de 300 substâncias (SFORCIN, 2016). As regiões mais importantes para a análise dos espectros de FTIR são as compreendidas entre 4000 e 1300 cm^{-1} , onde ocorrem as absorções dos grupos OH e C=O, e entre 900 e 650 cm^{-1} , que indicam a presença de anéis aromáticos. A região intermediária, entre 1300 e 900 cm^{-1} , conhecida como "impressão digital", é mais complexa e, geralmente, os modos de vibração são acoplados, porém é muito importante para determinação da estrutura (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). A Figura 18 ilustra as bandas características para própolis verde e vermelha. É possível verificar que ambos os extratos secos apresentam picos coincidentes na região de mais alta frequência (3410 a 2853 cm^{-1}). A partir de 900 até 400 cm^{-1} os espectros são semelhantes para ambos os extratos. Esta análise prévia indica a presença de grupos OH (alta frequência) e a presença de anéis aromáticos (baixa frequência) para ambos os extratos. Entretanto, observa-se uma variação dos picos de absorção na região entre 1500 e 900 cm^{-1} , indicando uma possível diferença na composição química entre os extratos analisados. A Tabela 7 mostra as atribuições das principais bandas de absorção para os extratos. Verifica-se que ambos os extratos apresentam picos característicos dos grupos funcionais para fenóis (O-H) e anéis aromáticos (C=C). Além disso, é possível observar picos característicos dos grupos C-O-C, indicando a presença de flavonoides em ambos os extratos.

Figura 18 - Espectros de FTIR para os extratos secos de própolis verde e vermelha.

Fonte: Própria autoria

Tabela 7 - Atribuição dos sinais obtidos em FTIR para os extratos secos de própolis verde e vermelha.

Própolis verde	Própolis vermelha	Atribuição	Referência
3400	3410	Deformação axial de O-H para fenóis	Gatea et al. (2015)
2971, 2929	2971, 2929	Deformação axial de C-H para aromáticos	Silverstein, Bassler, Morrill (1994)
2853	2853	Deformação axial de C-H para alifáticos	Sharaf, et al. (2013); Silverstein, Bassler, Morrill (1994)
1689	1619	Deformação axial para C=O	Sharaf et al. (2013)
1515, 1438	1508, 1438	Deformação axial de C=C para anel aromático	Sharaf et al. (2013); Silverstein, Bassler, Morrill (1994)
1257	1285	Deformação axial assimétrica para C-O-C	Silverstein, Bassler, Morrill (1994)
1034	1027	Deformação axial simétrica para C-O-C	Sharaf et al. (2013); Silverstein, Bassler, Morrill (1994)
860, 839	888, 832	Deformação angular fora do plano para C-H	Silverstein, Bassler, Morrill (1994)
700	700	Deformação angular fora do plano de C=C para anel aromático	Silverstein, assler, Morrill (1994)
665	630	Deformação angular fora do plano para O-H	Silverstein, Bassler, Morrill (1994)

Fonte: Própria autoria.

Os materiais HA e HA contendo própolis (HA-ETOH80, HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8) também foram submetidos às análises de FTIR, como ilustrado nas Figuras 19 e 20. Para a HA, é possível verificar picos característicos dos grupos PO_4^{-3} (1090, 1041, 964, 602 e 574 cm^{-1}) e grupo O-H (3571 cm^{-1}). Além disso, verifica-se ainda a presença de H_2O , caracterizada pelo pico em 3431 cm^{-1} e a presença de CO_3^{-2} com picos em 1459, 1410 e 874 cm^{-1} (Figuras 19 e 20). Outros autores já verificaram a presença de H_2O adsorvida em HA, obtida via precipitação química, devido a umidade do ar e, ainda, a presença de CO_3^{-2} adsorvido da atmosfera durante o processo de síntese, uma vez que o procedimento é realizado em sistema aberto (GUERRA-LOPEZ et al., 2015; HE; DONG; DENG, 2016; JAFARI et al., 2016; ROGINA et al., 2016; SINGH, 2016; ZHANG et al., 2016). A Tabela 8 mostra os sinais obtidos para cada banda de absorção para a amostra HA-ETOH80 e suas respectivas atribuições.

Nos espectros obtidos para as amostras HA-GP 20 e HA-GP8 (Figura 19) e HA-RP20 e HA-RP8 (Figura 20), é possível observar um pico em 2929 cm^{-1} , característico da presença de anéis aromáticos, conforme mostrado na Tabela 7. Observa-se, ainda, a presença de picos em 1606 e 1257 cm^{-1} para as amostras contendo própolis verde (Figura 19) e picos em 1619 e 1292 cm^{-1} para as amostras contendo própolis vermelha (Figura 20), picos atribuídos à presença de C=O e C-O-C (Tabela 7), respectivamente, sugerindo a presença de ácidos fenólicos e flavonoides nas amostras analisadas. Gatea et al. (2015) obtiveram nanopartículas de ouro contendo própolis, material utilizado em biomedicina e biotecnologia e observaram pico em 1632 cm^{-1} , atribuído à presença de grupos ácidos. Siripatrawan e Vitchayakitti (2016) produziram quitosana contendo própolis, material utilizado para embalagem e verificaram picos de 2930 , 1647 e 1257 cm^{-1} , indicando a presença de compostos fenólicos incorporados ao material.

Portanto, os resultados encontrados nesta análise, através dos sinais observados para FTIR, sugerem que ambos os extratos secos de própolis verde e vermelha foram incorporados à hidroxiapatita, indicando a presença de compostos fenólicos e flavonoides totais no biomaterial obtido.

Figura 19 - Espectros de FTIR para HA-ETOH80, HA-GP8 e HA-GP20.

Fonte: Própria autoria.

Figura 20 - Espectros de FTIR para HA-ETOH80, HA-RP8 e HA-RP20.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 8 - Atribuição dos sinais obtidos em FTIR para HA-ETOH80.

HA	Atribuição	Referência
3571	Deformação axial de O-H	Guerra-Lopez et al. (2015); Singh (2016); Zhang et al. (2016)
3431	Deformação axial para H ₂ O	Guerra-Lopez et al. (2015); Singh (2016); Zhang et al. (2016)
1640	Deformação angular fora do plano para H ₂ O	Guerra-Lopez et al. (2015); Singh (2016); Zhang et al. (2016)
1459 e 1410	Deformação axial simétrica para CO ₃ ⁻²	Jafari et al. (2016); Singh (2016); Zhang et al. (2016)
874	Deformação axial assimétrica para CO ₃ ⁻²	Rogina et al. (2016)
1090 e 1041	Deformação axial assimétrica para PO ₄	Guerra-Lopez et al. (2015); Jafari et al. (2016); Srilakshmi, Saraf (2016); Zhang et al. (2016)
964	Deformação axial simétrica para PO ₄	Guerra-Lopez et al. (2015); Rogina et al. (2016); Singh (2016); Zhang et al. (2016)
602 e 574	Deformação angular fora do plano para PO ₄	Guerra-Lopez et al. (2015); Rogina et al. (2016); Srilakshmi, Saraf (2016); Zhang et al. (2016)

Fonte: Própria autoria.

5.4 ESTUDO DA LIBERAÇÃO DE PRÓPOLIS AO LONGO DO TEMPO

O ensaio de liberação foi realizado em proporção de 2 % (m/v) em tampão TSB e as alíquotas coletadas ao longo do tempo (zero, 1/2, 1, 2, 4 e 9 horas).

5.4.1 Análise Espectrofotométrica

As análises espectrofotométricas na região do UV-visível (250 a 700 nm) foram realizadas com o objetivo de determinar o tempo necessário para máxima liberação de própolis das amostras e, ainda, compará-los aos picos de absorção máxima observados para os EEP (vermelha e verde). Todas as alíquotas obtidas nas liberações e os extratos de própolis foram submetidos às diluições apropriadas de modo a obter valores de absorbância inferiores a 1,0. Para os extratos de própolis verde e vermelha foram utilizadas as concentrações de 20 µg/mL, enquanto as amostras obtidas nas liberações de cada material foram diluídas 1:150 (HA-GP20 e HA-GP8) e 1:25 (HA-RP20 e HA-RP8).

A Figura 21 ilustra os espectros de absorção para os EEP de própolis verde e vermelha. É possível observar perfis de absorção semelhantes para ambos os extratos, com picos de absorção máxima em 289 e 280 nm, respectivamente. Espectros de absorção na região do UV-visível, típico de EEP, devem apresentar bandas de absorção entre 200 e 400 nm (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014). Estudos demonstram que essa faixa de absorção é atribuída a presença de compostos fenólicos e flavonoides (CASTRO et al., 2007; MIYATAKA et al., 1997; PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014; TOMAZZOLI et al., 2015). Apesar do EEP vermelha apresentar maior quantidade de flavonoides totais e o conteúdo de fenólicos totais não apresentarem diferenças significativas para estes extratos, o EEP verde apresentou maior valor de absorbância comparado ao EEP vermelha, indicando maior quantidade de substâncias solúveis no processo de extração para própolis verde, sugerindo que estas substâncias solúveis absorvem neste comprimento de onda, entretanto, não seriam necessariamente fenólicas.

Outros autores já realizaram a análise espectrofotométrica de extratos hidroalcoólicos de própolis e reportaram valores próximos aos valores encontrados no presente estudo. Castro et al. (2007) obtiveram EEP de diferentes regiões do Brasil e observaram picos máximos de absorção em 279 e 302 nm, atribuídos a presença de fenólicos totais. Em outro estudo, os autores analisaram EEP de diferentes origens geográficas e relataram valores de absorção entre 275 e 294 nm (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

Figura 21 - Espectros de absorção na região do UV-visível para os extratos etanólicos de própolis verde e vermelha.

Fonte: Própria autoria.

A Figura 22 ilustra os espectros de absorção para as liberações em tampão TSB, em função do tempo, utilizando as amostras HA-GP20 (Figura 22 A) e HA-GP8 (Figura 22 B). É possível observar que ambas as amostras apresentam perfil de absorção semelhante, com pico em 289 nm, mesmo valor encontrado para EEP verde. Além disso, observa-se maiores valores de absorbância para a liberação de própolis para a amostra HA-GP20, o que era esperado, uma vez que este material apresenta maior quantidade de própolis. Ainda, é possível verificar, para ambas as amostras, um perfil de absorção semelhante indicando a máxima liberação de própolis a partir de 30 minutos.

Figura 22 - Espectros de absorção na região do UV-visível para as amostras HA-GP20 (A) e HA-GP8 (B).

Fonte: Própria autoria.

A Figura 23 ilustra os espectros de absorção na região do UV-visível para as liberações em tampão TSB, utilizando as amostras HA-RP20 (Figura 23 A) e HA-RP8 (Figura 23 B). Verifica-se perfis de absorção semelhantes para ambas as amostras, com pico em 280 nm (coincidindo com o pico máximo para EEP vermelha), entretanto, é possível observar outro pico de absorção em 333 nm. Miyataka et al. (1997) obtiveram extratos aquoso e etanólico para própolis de diferentes origens geográficas. Os autores verificaram picos de absorção em 280 e 320 para extrato aquoso de origem brasileira, sendo estes picos atribuídos a compostos fenólicos e flavonoides totais. Como esperado, a amostra contendo maior quantidade de própolis (HA-RP20) apresentou maiores valores de absorbância máxima. Assim como observado para os materiais contendo própolis verde, não foi observada diferença na liberação de extrato a partir de 30 minutos para a amostra HA-RP8 (Figura 23 B). Entretanto, a liberação máxima observada para a amostra HA-RP20 (Figura 23 A) ocorre a partir de 4 horas de liberação. Para todos os ensaios (Figuras 22 e 23), além dos tempos citados, foram realizadas as coletas e análises espectrofotométricas nos tempos 6, 12 e 24 h, entretanto, não foram observadas diferenças em relação aos valores mostrados. Além disso, o ensaio de liberação controle, utilizando a amostra HA-ETOH80, não apresentou picos de absorção na faixa de 250 a 700 nm.

A diferença entre os perfis de absorção para o EEP vermelha e as liberações para as amostras contendo própolis vermelha (HA-RP20 e HA-RP8), destacando-se o pico de absorção em 333 nm, pode estar relacionada à natureza química do extrato, uma vez que a própolis vermelha apresenta grande quantidade de substâncias polares (ALENCAR et al., 2007), sugerindo que algumas destas substâncias poderiam ficar retidas na HA, de caráter hidrofílico (BARROS et al., 2014), enquanto outras substâncias seriam liberadas em solução tampão por apresentarem grande afinidade pela água, devido a formação de fortes ligações de hidrogênio com fenólicos e flavonoides presentes na própolis (ZHENG et al., 2016). Além disso, espectros de absorção na região do UV-visível, típico de flavonoides, devem apresentar duas bandas de absorção com picos máximos na faixa entre 240 e 285 nm e entre 300 e 550 nm (PAGANOTTI; REZENDE; BARBEIRA, 2014), sugerindo que as substâncias liberadas em tampão TSB podem conter quantidades significativas de flavonoides. Entretanto, para as amostras contendo própolis verde (HA-GP20 e HA-GP8) os resultados observados sugerem a presença das mesmas substâncias (não necessariamente nas mesmas quantidades) tanto no extrato como na liberação em tampão TSB, uma vez que os espectros apresentaram o mesmo perfil de absorção.

Figura 23 - Espectros de absorção na região do UV-visível para as amostras HA-GP20 (A) e HA-GP8 (B).

Fonte: Própria autoria.

5.4.2 Determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais

A determinação do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais, liberado pelas amostras, foi realizada com o objetivo de verificar a máxima liberação destes compostos ao longo do tempo e compará-los aos valores encontrados para os EEP verde e vermelha. Considerando os resultados observados na análise espectrofotométrica, foi determinado o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais para todas as amostras (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8) em função do tempo (zero, 1/2, 1, 2, 4). Adotou-se o tempo de 4 horas como o período de máxima liberação de própolis para todas as amostras.

A Figura 24 mostra o conteúdo de fenólicos totais liberado ao longo do tempo. É possível observar perfil semelhante para todas as amostras, com liberação praticamente estável a partir de 30 minutos. De modo geral, verifica-se que a liberação de fenólicos totais variou entre 200 e 300 mg EAG/g ES. A liberação máxima do conteúdo de flavonoides totais está ilustrada na Figura 25. Como esperado, as amostras apresentam perfis de liberação semelhantes, com liberação estável em aproximadamente 30 minutos. Ainda, é possível verificar maior quantidade de flavonoides liberada para as amostras contendo própolis vermelha (HA-RP20 e HA-RP8).

Os resultados para o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais para as liberações no tempo 4 horas e para os EEP verde e vermelha são mostrados na Tabela 9. Verificam-se valores muito próximos para o conteúdo de fenólicos totais observados nas liberações em relação aos EEP. É possível observar valores de $327,6 \pm 18,8$ e $296,8 \pm 2,5$ mg EAG/g ES para as amostras HA-GP20 e HA-RP20, respectivamente, sem diferença significativa entre eles e em relação aos valores encontrados para os EEP ($p < 0,05$). Além disso, observam-se menores valores para o conteúdo de fenólicos para as liberações das amostras HA-GP8 e HA-RP8 ($259,4 \pm 18,0$ e $228,3 \pm 20,1$ mg EQ/g ES), com diferença significativa em relação aos valores encontrados para os EEP, entretanto, sem diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). Por outro lado, o conteúdo de flavonoides totais encontrado para as liberações, a partir das amostras contendo própolis verde (HA-GP20 e HA-GP8), não apresentaram diferença significativa entre eles ($p < 0,05$), com valores de $14,18 \pm 0,7$ e $14,01 \pm 1,54$ mg EQ/g ES, respectivamente. Porém, todas as amostras apresentaram diferença significativa em relação aos extratos ($p < 0,05$), sendo os maiores valores encontrados para as amostras contendo própolis vermelha HA-RP20 ($35,8 \pm 1,3$ mg EQ/g ES) e HA-RP8 ($25,2 \pm 3,3$ mg EQ/g ES).

Figura 24 - Conteúdo de fenólicos totais, liberado em função do tempo, para as amostras HA-RP20, HA-RP8, HA-GP20 e HA-GP8.

Fonte: Própria autoria

Figura 25 - Conteúdo de flavonoides totais, liberado em função do tempo, para as amostras HA-RP20, HA-RP8, HA-GP20 e HA-GP8.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 9 - Quantidade de fenólicos e flavonoides totais para os EEP verde e vermelha e para as liberações no tempo 4 horas.

Amostras	Fenólicos (mg EAG/g ES)	Flavonoides (mg EQ/g ES)
EEP verde	325,6 ± 48,7^a	53,3 ± 1,2^A
HA-GP20	327,6 ± 18,8 ^a	14,2 ± 0,7 ^B
HA-GP8	259,4 ± 18,0 ^b	14,0 ± 1,5 ^B
EEP vermelha	317,4 ± 9,0^a	112,4 ± 7,6^C
HA-RP20	296,8 ± 2,5 ^a	35,8 ± 1,3 ^D
HA-RP8	228,3 ± 20,1 ^b	25,2 ± 3,3 ^E

Média ± desvio padrão (n = 3); Letras diferentes, maiúsculas e minúsculas, na mesma coluna, representam diferença significativa (p < 0,05).

Fonte: Própria autoria.

Diversos trabalhos utilizam a própolis em associação com biomateriais, a fim de se obter um dispositivo biológico que apresente características antimicrobianas. De modo geral, os biomateriais mais utilizados são os biopolímeros (ADOMAVICIUTE et al., 2015; DE LIMA et al., 2016; KIM et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). Além disso, a hidroxiapatita também tem sido associada a outros antimicrobianos, como nanopartículas de prata, cobre, níquel, cobalto e zinco (AJDUKOVIC et al., 2016; ALSHEMARY et al., 2015; YU et al., 2015) ou, ainda, com drogas sintéticas como clorexidina (SORIANO-SOUZA et al., 2015). Entretanto, há somente um único registro na literatura envolvendo hidroxiapatita e própolis, porém, neste estudo, não foi realizada a dosagem do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais após a liberação (GRENHO et al., 2015).

Desta forma, considerando a extração da própolis em etanol e a liberação em tampão TSB realizada neste estudo, só é possível comparar os valores encontrados com dados disponíveis na literatura, relacionados a extração de própolis em meios etanólico e aquoso. Mello e Hubinger (2012) determinaram o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais para extratos etanólico e aquoso em diferentes valores de pH. Os autores demonstraram melhores resultados para as extrações realizadas em pH 6 e 8, valor próximo ao pH da solução tampão TSB utilizada neste estudo (pH=7,4). Além disso, os autores demonstraram que o conteúdo de fenólicos totais para ambas as extrações, em pH=8, foram muito próximos. Da mesma forma, o conteúdo de flavonoides totais apresentaram valores similares, tanto para a extração alcoólica como para a extração aquosa, em pH=8. Os compostos fenólicos são considerados grupos ácidos e podem ser desprotonados em meio levemente básico, gerando o íon fenóxido,

aumentando a solubilidade em meio aquoso, sugerindo que a alta liberação de fenólicos totais, a partir das amostras de HA, estaria relacionada também as condições de pH do tampão TSB. Por outro lado, a menor quantidade observada neste estudo para o conteúdo de flavonoides totais liberada em tampão TSB, em relação ao EEP, pode estar relacionada à estrutura destes compostos, como natureza e tamanho dos substituintes ligados ao anel aromático, o que determinaria sua afinidade pela HA ou pela água (GANAPATHI et al., 2001).

5.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MATERIAIS

Considerando os resultados obtidos para atividade antibacteriana dos EEP, frente aos microrganismos utilizados (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli*), foi selecionada a bactéria *S. aureus* para determinação da atividade antibacteriana utilizando os materiais, uma vez que os resultados observados para *S. aureus* e *S. epidermidis* foram semelhantes e os EEP não apresentaram atividade frente à *E. coli*. Além disso, a utilização de *S. aureus* se justifica pela maior ocorrência em infecções relacionadas aos biomateriais (RISSING, 1997; SIMPSON; DEAKIN; LATHAM, 2001; TANDE; PATEL, 2014). Desta forma, a atividade antibacteriana das amostras contendo própolis verde e vermelha (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-GP8) foi verificada frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizando as metodologias de contagem de colônias bacterianas em placa e determinação das concentrações inibitória e bactericida mínima.

5.5.1 Contagem de colônias bacterianas em placa

A contagem de colônias bacterianas em placa foi realizada para todas as amostras (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-GP8) em função do tempo de contato com a suspensão bacteriana, contendo *S. aureus* em meio de cultura TSB (zero; 0,5; 1; 2 e 4 horas). Após cada tempo, uma alíquota de cada amostra foi semeada em placa de Petri contendo meio ágar MH e a contagem das colônias realizada após 24 horas de incubação a 37 °C. Além disso, foi realizado ensaio contendo a amostra HA-ETOH80 (controle negativo) e outro tubo contendo apenas meio MH com bactéria, a fim de avaliar o crescimento bacteriano (CB) e a eficiência da esterilização do meio. O ensaio foi realizado em duplicata para cada amostra e a contagem realizada após diluições seriadas (10^0 ; 10^2 e 10^3).

A Figura 26 ilustra as colônias de *S. aureus* após o contato com as amostras em suspensão bacteriana, em função do tempo. É possível observar, para todas as amostras, o

crescimento de colônias bacterianas no tempo zero (Figura 26 A). Por outro lado, a partir de 0,5 hora, observa-se a formação de colônias apenas para as amostras contendo menor quantidade de própolis (HA-GP8 e HA-RP8) (Figura 26 B). A partir de 1 h de contato, não há formação de colônias bacterianas para nenhuma das amostras utilizadas (Figura 26 C, D e E). Ainda, é possível observar que não houve contaminação do meio TSB para o crescimento bacteriano (CB) e o controle contendo HA aparentemente não inibiu o crescimento das bactérias.

A Figura 27 mostra as porcentagens de redução bacteriana, ao longo do tempo, para todas as amostras em relação ao controle (HA-ETOH80). Verifica-se, a partir do tempo inicial (zero h), valores de redução bacteriana para as amostras contendo própolis verde de 24,2% (HA-GP20) e 19,8% (HA-GP8) (Figura 27 A), enquanto para as amostras contendo própolis vermelha, observa-se valores de 10,4% (HA-RP20) e 39,6% (HA-RP8) (Figura 27 B). A partir de 0,5 hora de contato, verifica-se 100% de redução bacteriana para as amostras contendo maior quantidade de própolis (HA-GP20 e HA-RP20), enquanto as amostras contendo menor quantidade de própolis apresentam valores de 92,6% (HA-GP8) e 95,8% (HA-RP8) (Figuras 27 A e B). Finalmente, a partir de 1 hora em contato com a suspensão bacteriana, é possível observar 100% de redução bacteriana para todas as amostras (Figuras 27 A e B).

Figura 26 - Imagens das placas de Petri mostrando as colônias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, formadas após contato das amostras com a suspensão bacteriana nos tempos zero h (A), 0,5 h (B), 1 h (C), 2 h (D) e 4 h (E).

*CB representa o crescimento bacteriano; HA representa a amostra controle HA-ETOH80.

Diluição: 10^3

Fonte: Própria autoria.

Figura 27 - Porcentagem de redução bacteriana, ao longo do tempo, para a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 utilizando as amostras HA-GP20 e HA-GP8 (A) e HA-RP20 e HA-RP8 (B).

Fonte: Própria autoria.

Os resultados observados para porcentagem de redução bacteriana mostram que os materiais contendo maior quantidade de própolis (HA-GP20 e HA-RP20) apresentaram efeito bactericida contra *S. aureus* a partir de 0,5 h, enquanto os materiais contendo menor quantidade de própolis apresentaram o mesmo efeito a partir de 1 h em contato com a suspensão bacteriana. A atividade antimicrobiana atribuída à própolis está relacionada a sua

composição química, especificamente pela presença de compostos fenólicos, conforme discutido anteriormente neste trabalho. Assim, os resultados apresentados para as amostras HA-GP20 e HA-RP20, mostrando maior velocidade para ação bactericida frente à *S. aureus*, indicam que este efeito estaria relacionado à maior quantidade de compostos fenólicos apresentadas por estas amostras no ensaio de liberação. Da mesma forma, o tempo necessário para morte bacteriana, 0,5 h para as amostras HA-GP20 e HA-RP20 e 1 h para as amostras HA-GP8 e HA-RP8, estão de acordo com os resultados encontrados na análise espectrofotométrica, que indicam a máxima liberação possível de própolis a partir de 0,5 hora. Grenho et al. (2015) obtiveram HA contendo própolis verde e vermelha em concentrações menores, comparado ao presente estudo. Foi observado 45 e 61% de redução do número de bactérias viáveis (*S. aureus*) para HA contendo própolis verde (12 e 25 µg/mL, respectivamente) e 99% para HA contendo própolis vermelha (mesmas concentrações), entretanto, neste estudo, o tempo de contato entre o material contendo própolis e o microrganismo foi de 24 horas.

Portanto, os resultados encontrados neste ensaio mostram que, após a liberação máxima possível de extrato, ou seja, 100% de liberação, todas as amostras apresentam efeito bactericida em intervalos de tempo entre 0,5 e 1 h. Entretanto, outros testes são necessários a fim de melhor investigar a quantidade necessária de liberação visando a determinação da CIM e CBM dos materiais frente ao mesmo microrganismo.

5.5.2 Determinação da CIM e CBM

O ensaio para determinação da CIM e CBM foi realizado para todas as amostras (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8), após a liberação em meio de cultura TSB, a fim de melhor investigar as características antibacterianas dos materiais e, ainda, comparar com os valores determinados para os EEP. A amostra HA-ETOH80% foi utilizada como controle negativo e o ensaio realizado nas mesmas proporções utilizadas no ensaio de liberação, ou seja, a 2% (m/v). A liberação foi realizada em meio de cultura TSB durante 4 horas, sendo esta a concentração máxima de liberação possível (100%). Após a liberação, o meio TSB contendo o extrato concentrado (100%) foi submetido à diluições seriadas para realização dos ensaios. Além disso, foi considerada a concentração de extrato (µg/mL) determinada no ensaio para o cálculo do conteúdo de fenólicos e flavonoides totais.

O resultado do ensaio para determinação da CIM está ilustrado na Figura 28. As colunas 3 e 4 representam as amostras contendo maior quantidade de própolis (HA-GP20 e HA-RP20), enquanto as colunas 7 e 8 representam as amostras contendo menor quantidade de própolis (HA-GP8 e HA-RP8) (Figura 28 A e B). É possível verificar valores para CIM que correspondem a 12,5% de liberação (HA-GP20 e HA-RP20) e 25% de liberação (HA-GP8 e HA-RP8). Ainda, verifica-se que os poços contendo o branco (A1 e A2) e o controle positivo (C1 e C2) não apresentaram crescimento bacteriano, enquanto nos poços contendo o inóculo com PBS (B1 e B2) e controle negativo (D1 e D2), foi verificado o crescimento bacteriano.

Figura 28 - Determinação da CIM utilizando corante resazurina, frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, na presença de: Branco (A1 e A2), crescimento bacteriano (B1 e B2), controle positivo (C1 e C2) e controle negativo (D1 e D2). São exibidas as imagens para as liberações (4 h) das amostras HA-GP20 e HA-GP8 (A); HA-RP20 e HA-RP8 (B).

Fonte: Própria autoria.

Após a determinação da CIM, a CBM foi verificada pela observação do crescimento bacteriano em placa, utilizando apenas os tubos contendo os extratos com concentrações superiores à CIM. As imagens das placas, indicando os resultados para CBM, são mostrados na Figura 29. É possível verificar, para as amostras HA-GP20 e HA-RP20, valores para CBM que correspondem a 50% de liberação de extrato (Figura 29 A e C), enquanto as amostras HA-GP8 e HA-RP8 apresentam valores para CBM de 100% de liberação (Figura 29 B e D).

Figura 29 - Determinação da CBM frente à bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. São exibidas as imagens para a amostra HA-GP20 (A), HA-GP8 (B), HA-RP20 (C) e HA-RP8 (D).

Fonte: Própria autoria.

É importante destacar que, além das concentrações expressas em % de liberação, foram consideradas também as concentrações das liberações em $\mu\text{g/mL}$, calculadas para todas as amostras (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8) utilizando tampão TSB (0,5 g/L de NaCl e 2,5 g/L de K_2HPO_4). Ainda, no ensaio para determinação da concentração em $\mu\text{g/mL}$, foram realizadas as liberações utilizando a amostra HA-ETOH80 (controle negativo) e descontando o valor referente à massa de sal presente nas liberações. A Tabela 10 mostra os valores para CIM e CBM das liberações utilizando todas as amostras, bem como os valores para os EEP e, ainda, o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais

Tabela 10 - Valores para CIM, CBM (*S. aureus*), fenólicos e flavonoides totais para os EEP e para as liberações no tempo 4 horas.

Amostra	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	Fenólicos (mg EAG/g ES)	Flavonoides (mg EQ/g ES)
EEP verde	> 100	> 800	325,6 $\pm$ 48,7^a	53,3 $\pm$ 1,2^A
HA-GP20	> 175,4	> 701,5	327,6 $\pm$ 18,8 ^a	14,2 $\pm$ 0,7 ^B
HA-GP8	> 182	> 728	259,4 $\pm$ 18,0 ^b	14,0 $\pm$ 1,5 ^B
EEP vermelha	> 12,5	> 800	317,4 $\pm$ 9,0^a	112,4 $\pm$ 7,6^C
HA-RP20	> 51,7	> 206,5	296,8 $\pm$ 2,5 ^a	35,8 $\pm$ 1,3 ^D
HA-RP8	> 66,8	> 267	228,3 $\pm$ 20,1 ^b	25,2 $\pm$ 3,3 ^E

Fonte: Própria autoria.

É possível verificar valores para CIM de 175,4 e 182 $\mu\text{g/mL}$ para as amostras HA-GP20 e HA-GP8, respectivamente. Além disso, verifica-se valores para CBM de 701,5 e 728 $\mu\text{g/mL}$ para as mesmas amostras, respectivamente, indicando que a maior atividade inibitória e bactericida apresentada para amostra HA-GP20 estaria relacionada à maior quantidade de fenólicos apresentada pela liberação desta amostra (Tabela 10). Para as amostras HA-RP20 e HA-RP8, é possível observar valores para CIM de 51,7 e 66,8 $\mu\text{g/mL}$ e para CBM de 206,5 e 267 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, indicando que a maior atividade inibitória e bactericida apresentada para a amostra HA-RP20 estaria relacionada à maior quantidade de fenólicos e flavonoides presentes na liberação a partir desta amostra (Tabela 10). Além disso, verifica-se, para todas as amostras (HA-GP20, HA-GP8, HA-RP20 e HA-RP8), menor atividade inibitória (maior valor para CIM) e maior atividade bactericida (menor valor para CBM) comparado aos EEP verde e vermelha. Esta característica apresentada pelos compostos presentes na liberação, a partir das amostras, poderia estar relacionada à interação destes compostos com a HA, sugerindo que os compostos fenólicos e flavonoides liberados apresentam maior efeito bactericida, entretanto, o efeito sinérgico destes compostos com aqueles retidos na HA apresentaria maior efeito inibitório. Além disso, é possível observar maior atividade inibitória e bactericida para HA contendo própolis vermelha. Grenho et al. (2015) observaram maior atividade inibitória frente à *S. aureus* para HA contendo própolis vermelha de origem brasileira, comparado à HA contendo própolis verde. A maior atividade inibitória, verificada para própolis vermelha, foi atribuída às diferenças na composição

química dos extratos, em especial pela presença de ácido cinâmico (ácido fenólico) e crisina (flavonoide) presentes na própolis vermelha.

Ainda, é possível observar que as amostras contendo própolis vermelha (HA-RP20 e HA-RP8) apresentam diferenças mais expressivas para CIM e CBM, comparado ao EEP vermelha. Esta diferença poderia estar relacionada às diferenças entre os perfis de absorção na região do UV-visível para estas amostras e o EEP vermelha (Figuras 21 e 23), indicando que a atividade inibitória e bactericida se deve ao tipo de substância (fenólicos e flavonoides) liberada a partir da HA e não apenas à quantidade destes compostos. Entretanto, a menor diferença para CIM e CBM entre as amostras contendo própolis verde (HA-GP20 e HA-GP8) e o EEP verde sugerem a presença do mesmo tipo de substâncias tanto na liberação como no extrato, exibindo perfis de absorção semelhantes (Figuras 21 e 22).

5.6 VIABILIDADE CELULAR - MÉTODO DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

Considerando os resultados satisfatórios para a atividade antibacteriana, observados para todas as amostras utilizadas neste trabalho, foram selecionados os materiais contendo menores quantidades de própolis verde e vermelha, ou seja, HA-GP8 e HA-RP8, para determinação da viabilidade celular.

O ensaio de biocompatibilidade para as amostras foi realizado pela metodologia de incorporação do vermelho neutro que, além de determinar o possível efeito citotóxico do material, ainda indica o mecanismo de ação do mesmo frente à linhagem celular (LOPEZ et al., 2015). Neste sentido, o corante vermelho neutro indica uma variação na função da matriz lisossomal, uma vez que é capaz de atravessar a membrana e formar ligações eletrostáticas com a mesma. Assim, o comprometimento da matriz provoca uma diminuição da captura do corante (CIAPETTI et al., 1996; ROGERO et al., 2003).

As curvas de viabilidade celular para as amostras e controles são mostradas na Figura 30. É possível observar que a amostra HA-ETOH80 e o controle negativo (alumina) não apresentam efeito citotóxico, exibindo viabilidade celular acima de 80%. Por outro lado, verifica-se perfis semelhantes para as amostras (HA-GP8 e HA-RP8) e controle positivo (fenol), onde o aumento da concentração da amostra provoca uma diminuição da viabilidade celular. Segundo a Norma ISO 10995-2 (2009), quando a maior concentração de extrato (100%) apresenta viabilidade celular $\geq 70\%$, a amostra pode ser considerada não tóxica.

Entretanto, quando a maior concentração (100%) apresenta viabilidade celular $\leq 70\%$, deve ser calculada a concentração que reflete 50% da viabilidade celular (IC_{50}).

Figura 30 - Curva de viabilidade celular para as amostras HA-GP8, HA-RP8, HA-ETOH80 e controles negativo (alumina) e positivo (fenol) pela incorporação de VN, utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de Hamster chinês).

Fonte: Própria autoria.

Neste sentido, foram obtidas as curvas de porcentagem de viabilidade celular em função da concentração ($\mu\text{g/mL}$) de extrato liberado para as amostras HA-GP8 e HA-RP8 (Figura 31) e os valores médios ajustados para equações lineares apresentaram coeficientes de determinação (r^2) de 0,9194 e 0,9654 para a amostra HA-GP8 (Figura 31 A) e HA-RP8 (Figura 31 B), respectivamente. Os valores para IC_{50} foram de 387,1 $\mu\text{g/mL}$ e 84,8 $\mu\text{g/mL}$ para as amostras HA-GP8 e HA-RP8, respectivamente, sugerindo maior atividade citotóxica para a própolis vermelha, comparada à própolis verde. Até o momento, é possível encontrar na literatura um único trabalho envolvendo HA incorporada com EEP. Neste trabalho, Grenho et al. (2015) utilizou soluções de EEP verde e vermelha em concentrações bem inferiores (6, 12 e 25 $\mu\text{g/mL}$), comparado ao presente estudo. Os materiais não apresentaram atividade citotóxica frente a fibroblastos de ratos.

Desta forma, é possível comparar os valores encontrados para IC_{50} com estudos relacionados à atividade citotóxica para extratos de própolis. Trabalhos recentes utilizam EEP a fim de avaliar a atividade citotóxica frente à linhagem de células sadias (LOPEZ et al., 2015; MACHADO, C. S. et al., 2016) bem como sua ação frente às células tumorais (FROZZA et al., 2013; MACHADO, B. A. S. et al., 2016; MACHADO, C. S. et al., 2016). Além disso, o maior efeito citotóxico para os extratos de própolis vermelha, comparado à própolis verde, também são reportados em outros trabalhos (FRANCHI et al., 2012; MACHADO, B. A. S. et al., 2016; MACHADO, C. S. et al., 2016).

Lopez et al. (2015) avaliaram a atividade citotóxica de EEP vermelha de diferentes estados da região nordeste do Brasil, frente à células sadias, e verificaram valores para IC_{50} entre 65 e 85 $\mu\text{g/mL}$. Frozza et al. (2013) avaliaram EEP vermelha do Sergipe, estado brasileiro, e reportaram valores entre 81,40 e 85,77 $\mu\text{g/mL}$, frente à células tumorais HeLa. Cabral et al. (2012) avaliaram EEP da região nordeste do Brasil frente à células tumorais HeLa e verificaram IC_{50} de 60 $\mu\text{g/mL}$. Outros estudos indicam a atividade citotóxica para própolis verde (FRANCHI et al., 2012; MACHADO, B. A. S. et al., 2016), entretanto, nestes trabalhos, não foram calculados valores para IC_{50} . Assim, é possível comparar os valores de IC_{50} encontrados para própolis verde do presente trabalho, com valores encontrados para outros EEP de origem brasileira. Machado, C. S. et al. (2016) e Meneghelli et al. (2013) avaliaram a atividade citotóxica de EEP marrom da região sul do Brasil, frente à células sadias e verificaram valor para IC_{50} de 461 e 364 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, valores próximos aos reportados neste trabalho.

A maior atividade citotóxica apresentada para a amostra HA-RP8, comparada com amostra HA-GP8, pode estar relacionada à maior quantidade de flavonoides liberados pelo material contendo própolis vermelha (HA-RP8). Estudos indicam que a atividade citotóxica apresentada por EEP vermelha pode estar relacionado à presença de isoflavonas como formononetina (FROZZA et al., 2014; LOPEZ et al., 2015; PICCINELLI et al., 2011). Da mesma forma, a atividade citotóxica apresentada pela amostra contendo própolis verde (HA-GP8) pode estar relacionada a sua composição química, pela presença de ácidos fenólicos como artepillin C e ácido p-cumárico (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; MACHADO, B. A. S. et al., 2016).

Figura 31 - Curva de viabilidade celular em função da concentração para as amostras HA-GP8 (A) e HA-RP8 (B), utilizando linhagem celular CHO-K1 (ovário de ramster Chinês).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 - Valores para atividade citotóxica (IC₅₀) e antibacteriana (CIM e CBM) para as amostras HA-GP8 e HA-RP8.

Amostra	IC₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
HA-GP8	387,1	> 182	> 728
HA-RP8	84,8	> 66,8	> 267

Fonte: Própria autoria.

Ainda, é possível comparar os valores para IC₅₀ encontrados neste ensaio com os valores reportados para CIM e CBM, a partir das amostras HA-GP8 e HA-RP8 (Tabela11). Observa-se, para ambas as amostras, (HA-GP8 e HA-RP8) valores para CIM abaixo dos valores encontrados para IC₅₀, indicando que a concentração necessária para inibir o crescimento bacteriano frente à *S. aureus*, não apresenta efeito citotóxico frente à linhagem celular utilizada no presente trabalho. Entretanto, a concentração de extrato necessária para causar morte bacteriana (CBM) apresenta valores acima da IC₅₀, indicando possível efeito citotóxico dos materiais nesta concentração.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam que os extratos de própolis marrom, verde e vermelha apresentam atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis*. Por outro lado, estes extratos não foram efetivos frente à bactéria Gram-negativa *E. coli*. As metodologias de caracterização para hidroxiapatita contendo própolis verde e vermelha indicam a presença de substâncias com potencial antimicrobiano como fenólicos e flavonoides, sem modificar a estrutura cristalina do biomaterial sintetizado. Os resultados confirmam que a hidroxiapatita contendo própolis verde e vermelha apresenta atividade inibitória e bactericida frente ao microrganismo *S. aureus*, mostrando rápida ação bactericida. Foi observado maior potencial antimicrobiano para hidroxiapatita contendo própolis vermelha, sendo esta atividade atribuída ao maior conteúdo de flavonoides apresentado por este extrato. Entretanto, os biomateriais apresentaram características citotóxicas, considerando a liberação total de própolis a partir das amostras.

Portanto, os resultados encontrados neste estudo mostram que a hidroxiapatita contendo própolis verde e vermelha poderia ser utilizada para aplicações biomédicas, inibindo o crescimento de *S. aureus*, entretanto, não poderia ser utilizada como bactericida, uma vez que a concentração necessária para este efeito supera os valores para IC₅₀, apresentado características citotóxicas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Preparar hidroxiapatita contendo menores quantidades de própolis e avaliar a atividade citotóxica destes materiais.
- Avaliar a atividade antimicrobiana destes novos materiais frente à *S. aureus* e *S. Epidermidis*.
- Melhor investigar a morfologia dos novos materiais obtidos.
- Realizar estudo *in vivo* a fim de melhor investigar a citotoxicidade dos materiais obtidos neste estudo.

REFERÊNCIAS

- ADOMAVICIUTE, E. et al. Formation and biopharmaceutical characterization of electrospun pvp mats with propolis and silver nanoparticles for fast releasing wound dressing. **Biomed Research International**, New York, 2016.
- ADOMAVICIUTE, E. et al. Formation and analysis of electrospun nonwoven mats from bicomponent pva/aqueous propolis nano-microfibres. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, Lodz, v. 23, n. 5, p. 35-41, Sep-Oct. 2015.
- AJDUKOVIC, Z. R. et al. In vitro evaluation of nanoscale hydroxyapatite-based bone reconstructive materials with antimicrobial properties. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Valencia, v. 16, n. 2, p. 1420-1428, Feb. 2016.
- ALBUHAIRAN, B.; HIND, D.; HUTCHINSON, A. Antibiotic prophylaxis for wound infections in total joint arthroplasty: a systematic review. **Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume**, London, v. 90B, n. 7, p. 915-919, Jul. 2008.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 278-283, Sep. 5 2007.
- ALSHEMARY, A. Z. et al. Synthesis, characterization, in vitro bioactivity and antimicrobial activity of magnesium and nickel doped silicate hydroxyapatite. **Ceramics International**, Kidlington, v. 41, n. 9, p. 11886-11898, Nov. 2015.
- ALTUNSOY, M. et al. In Vitro evaluation of microleakage and microhardness of ethanolic extracts of propolis in different proportions added to glass ionomer cement. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Boston, v. 40, n. 2, p. 136-140, 2016.
- AMERICAN DENTAL, A.; AMERICAN ACADEMY OF ORTHOPEDIC, S. Antibiotic prophylaxis for dental patients with total joint replacements. **Journal of the American Dental Association**, Chigaco, v. 134, n. 7, p. 895-9, Jul. 2003.
- ANDRADE, F. A. C. et al. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver nanoparticles-hydroxyapatite composites by a simple and eco-friendly method. **Ceramics International**, Kidlington, v. 42, n. 2, p. 2271-2280, Feb. 2016.
- ARAUJO, K. S. D. et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (Meliponinae) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 61-68, Jan-Mar 2016.
- ARCOS, D.; VALLET-REGI, M. Bioceramics for drug delivery. **Acta Materialia**, Kidlington, v. 61, n. 3, p. 890-911, Feb. 2013.
- ASTANI, A. et al. Antimicrobial activity of propolis special extract GH 2002 against multidrug-resistant clinical isolates. **Pharmazie**, Eschborn, v. 68, n. 8, p. 695-701, Aug. 2013.

- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, Aug. 2005.
- BANKOVA, V. et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift Fuer Naturforschung C-a Journal of Biosciences**, Berlin, v. 51, n. 5-6, p. 277-280, May-Jun. 1996.
- BANKOVA, V. et al. Chemical-Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. **Zeitschrift Fuer Naturforschung C-a Journal of Biosciences**, Berlin, v. 50, n. 3-4, p. 167-172, Mar-Apr. 1995.
- BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, Paris, v. 31, n. 1, p. 3-15, Jan-Feb. 2000.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 15, n. 7, p. 561-571, Nov. 2001.
- BANYARD, D. A. et al. Regenerative biomaterials: a review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Philadelphia, v. 135, n. 6, p. 1740-8, Jun. 2015.
- BARLAK, Y. et al. Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. **Proteome Science**, London, v. 9, art. 74, Dec. 2011.
- BARROS, J. et al. Influence of nanohydroxyapatite surface properties on Staphylococcus epidermidis biofilm formation. **Journal of Biomaterials Applications**, London, v. 28, n. 9, p. 1325-1335, May. 2014.
- BARUD, H. D. et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, art. 703024, 2013.
- BENHANIFIA, M. et al. chemical composition and antimicrobial activity of propolis collected from some localities of Western Algeria. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 43, n. 3, p. 482-488, Sep. 2014.
- BERBARI, E. F. et al. Dental procedures as risk factors for prosthetic hip or knee infection: a hospital-based prospective case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 50, n. 1, p. 8-16, Jan. 2010.
- BHULLAR, S. K.; LALA, N. L.; RAMKRISHNA, S. Smart biomaterials - a review. **Reviews on Advanced Materials Science**, St Petersburg, v. 40, n. 3, p. 303-314, Jun. 2015.
- BITTENCOURT, M. L. F. et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, Kidlington, v. 76, p. 449-457, Oct. 2015.
- BOANINI, E.; GAZZANO, M.; BIGI, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 6, n. 6, p. 1882-1894, Jun. 2010.

BODINI, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **Lwt-Food Science and Technology**, London, v. 51, n. 1, p. 104-110, Apr. 2013.

BONFIM, R. F. A. et al. Antimicrobial activity of bioactive glass associated to Brazilian red and green propolis. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 75, n. 9, p. 1078-1078, Jul. 2009.

BONVEHI, J. S.; GUTIERREZ, A. L. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 1351-1358, Apr. 2012.

BRAISSANT, O. et al. Novel microcalorimetric assay for antibacterial activity of implant coatings: The cases of silver-doped hydroxyapatite and calcium hydroxide. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 103, n. 6, p. 1161-1167, Aug. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Datasus. **Sistema de informação de saúde**. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>>. Acesso em: 05 de nov. 2016.

BRYAN, J.; REDDEN, P.; TRABA, C. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Chichester, v. 62, n. 2, p. 192-198, Feb. 2016.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-Inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 61, n. 19, p. 4546-4550, May. 15 2013.

CABRAL, I. S. R. et al. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 48, n. 3, p. 557-564, Jul-Sep. 2012.

CALLISTER, W. D. **Fundamentos da ciência e engenharia de materiais: uma abordagem integrada**, Rio de Janeiro: LTC, 2006.

CAMPOS, J. F. et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *tetragonisca fiebrigi* (Jatai). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, art. 296186, 2015.

CARMONA, V. O. et al. Effect of silver nanoparticles in a hydroxyapatite coating applied by atmospheric plasma spray. **International Journal of Electrochemical Science**, Pennington, v. 9, n. 12, p. 7471-7494, Dec. 2014.

CASTRO, M. L. et al. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 9, artg. 25, Jul. 2009.

CASTRO, M. L. et al. Propolis from southeastern and northeastern of Brazil: the influence of seasonality in antibacterial activity and phenolic composition. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CHAN, G. C. F.; CHEUNG, K. W.; SZE, D. M. Y. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, Totowa, v. 44, n. 3, p. 262-273, Jun. 2013.

CHEN, L. A. et al. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. **Nanotechnology**, Bristol, v. 22, n. 10, Mar. 2011.

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for medical applications: a picture for the next 20 years. **Journal of the European Ceramic Society**, London, v. 29, n. 7, p. 1245-1255, Apr. 2009.

CHINSEMBU, K. C. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. **Acta Tropica**, Amsterdam v. 154, p. 6-18, Feb. 2016.

CIAPETTI, G. et al. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 17, n. 13, p. 1259-1264, Jul. 1996.

DARWISH, R. M. et al. Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, n. 36, p. 5966-5974, Sep. 2010.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis: chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 5, n. 4, p. 435-441, Dec. 2008.

DAVIES, J. E. In vitro modeling of the bone/implant interface. **Anatomical Record**, Hoboken, v. 245, n. 2, p. 426-445, Jun. 1996.

DE LIMA, G. G. et al. Extraction method plays critical role in antibacterial activity of propolis-loaded hydrogels. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 105, n. 3, p. 1248-1257, Mar. 2016.

DE LUCA, M. P. et al. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. **Biomed Research International**, New York, art. 348647, 2014.

DIEKEMA, D. J. et al. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 32, p. S114-S132, May. 2001.

DIZAJ, S. M. et al. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 44, p. 278-284, Nov. 2014.

DOLLWET, H. H. A.; SORENSON, J. R. J. Historic uses of copper-compounds in medicine. **Trace Elements in Medicine**, Oberhaching, v. 2, n. 2, p. 80-87, 1985.

DOROZHKIN S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 31, n. 7, p. 1465-1485, Mar. 2010.

DOROZHKIN S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**. Basel, v. 2, p. 399–498, 2009

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics based on calcium orthophosphates (Review). **Glass and Ceramics**, New York, v. 64, n. 11-12, p. 442-447, Nov. 2007.

DRAPAK, S. I. et al. X-ray diffraction study of the molecular propolis films deposited from an alcohol solution onto the cleavage surfaces of layered V(2)VI(3) compounds. **Technical Physics**, Moscow, v. 53, n. 9, p. 1215-1221, Sep. 2008.

DRAPAK, S. I. et al. X-ray diffraction investigation of the structure of propolis films. **Physics of the Solid State**, Moscow, v. 48, n. 8, p. 1602-1604, Aug. 2006.

DUARTE, S. et al. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, v. 26, n. 4, p. 527-531, Apr. 2003.

ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates**. Amsterdam: Elsevier, 1994.

FALCAO, S. I. et al. Phenolic profiling of portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 24, n. 4, p. 309-318, Jul-Aug. 2013.

FERNANDES-SILVA, C. C. et al. chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 237-240, 2013.

FEY, P. D.; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future Microbiology**, London, v. 5, n. 6, p. 917-933, Jun. 2010.

FIELDING, G. A. et al. Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 8, n. 8, p. 3144-3152, Aug. 2012.

FONSECA, F. M. **Biocerâmicas porosas bifásicas e trifásicas à base de hidroxiapatita produzida por gelcasting**. 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

FRANCA, J. R. et al. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, art. 478, Dec. 2014.

FRANCHI, G. C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian Propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Dordecht, art. 918956, 2012.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy les Moulineaux, v. 110, p. 267-279, Mar. 2016.

FROZZA, C. O. D. et al. Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 63, p. 195-204, Jan. 2014.

FROZZA, C. O. D. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 52, p. 137-142, Feb. 2013.

GANAPATHI, M. R. et al. Nucleophilic effects on the deprotonation of phenol radical cations. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 337, n. 4-6, p. 335-340, Apr. 2001.

GATEA, F et al. Antitumour, antimicrobial and catalytic activity of gold nanoparticles synthesized by different pH propolis extracts. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 17, n. 7, artg. 320, Jul. 2015.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 1978.

GENTRY, L. O. Management of osteomyelitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 37-42, Jun. 1997.

GOBBO, L. A. **Aplicação da difração de raios X e método de Rietveld no estudo do cimento portland**. 2009. 273 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GRENHO, L. et al. In vitro antimicrobial activity and biocompatibility of propolis containing nanohydroxyapatite. **Biomedical Materials**, Bristol, v. 10, n. 2, art. 025004, Apr. 2015.

GUERRA-LOPEZ, J. R. et al. Synthetic hydroxyapatites doped with Zn(II) studied by X-ray diffraction, infrared, Raman and thermal analysis. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, Kidlington, v. 81, p. 57-65, Jun. 2015.

HATUNOGLU, E. et al. Antibacterial and mechanical properties of propolis added to glass ionomer cement. **Angle Orthodontist**, Lawrence, v. 84, n. 2, p. 368-373, Mar. 2014.

HAUSEN, B. M. et al. Propolis allergy .1. origin, properties, usage and literature-review. **Contact Dermatitis**, Hoboken, v. 17, n. 3, p. 163-170, Sep. 1987.

HE, L. Y.; DONG, G.; DENG, C. L. Effects of strontium substitution on the phase transformation and crystal structure of calcium phosphate derived by chemical precipitation. **Ceramics International**, Kidlington, v. 42, n. 10, p. 11918-11923, Aug. 1 2016.

HEIMANN, R. B. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. **Surface & Coatings Technology**, Lausanne, v. 233, p. 27-38, Oct. 25 2013.

HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, Malden, v. 81, n. 7, p. 1705-1728, Jul. 1998.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, Malden, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, Jul. 1991.

HENCH, L. L.; WILSON, J. Bioceramics. **Mrs Bulletin**, New York, v. 16, n. 9, p. 62-74, Sep. 1991.

HU, F. L. et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 100, n. 3, p. 276-283, Sep. 2005.

HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

HUANG, Y. et al. Antibacterial efficacy, corrosion resistance, and cytotoxicity studies of copper-substituted carbonated hydroxyapatite coating on titanium substrate. **Journal of Materials Science**, New York, v. 50, n. 4, p. 1688-1700, Feb. 2015.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDADIZATION – ISO. **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, 2009.

_____. **ISO 10993-12**: Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials, 2004

JAFARI, S. et al. Methylprednisolone acetate-loaded hydroxyapatite nanoparticles as a potential drug delivery system for treatment of rheumatoid arthritis: in vitro and in vivo evaluations. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 91, p. 225-235, Aug. 2016.

KAO, C. T. et al. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. **European Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 198-203, Apr. 2007.

KENAWY, E. R.; WORLEY, S. D.; BROUGHTON, R. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review. **Biomacromolecules**, Washington, v. 8, n. 5, p. 1359-1384, May. 2007.

KIM, J. I. et al. Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 44, p. 52-57, Nov. 1 2014.

KIM, S. Changes in surgical loads and economic burden of hip and knee replacements in the US: 1997-2004. **Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research**, Hoboken, v. 59, n. 4, p. 481-488, Apr. 15 2008.

KLOUCHE, S.; SARIALI, E.; MAMOUDY, P. Total hip arthroplasty revision due to infection: A cost analysis approach. **Orthopaedics & Traumatology-Surgery & Research**, Issis les Moulineaux, v. 96, n. 2, p. 124-132, Apr. 2010.

KNETSCH, M. L. W.; KOOLE, L. H. New strategies in the development of antimicrobial coatings: the example of increasing usage of silver and silver nanoparticles. **Polymers**, Basel, v. 3, n. 1, p. 340-366, Mar. 2011.

KOLMAS, J.; GROSZYK, E.; KWIATKOWSKA-ROZYCKA, D. Substituted Hydroxyapatites with antibacterial properties. **Biomed Research International**, New York, art. 178123, 2014.

KONOPKA, K. et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1312, n. 3, p. 186-196, Jul. 1996.

KOO, H. et al. Effect of a new variety of Apis mellifera propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, Sep. 2000.

KOO, H. et al. Effects of compounds found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, May. 2002.

KRISHNAN, A. G. et al. Evaluation of antibacterial activity and cytocompatibility of ciprofloxacin loaded gelatin-hydroxyapatite scaffolds as a local drug delivery system for osteomyelitis treatment. **Tissue Engineering Part A**, New Rochelle v. 21, n. 7-8, p. 1422-1431, Apr. 2015.

KUBILIENE, L. et al. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 15, May. 2015.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 235-240, Mar. 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

KURTZ, S. M. et al. Economic Burden of periprosthetic joint infection in the United States. **Journal of Arthroplasty**, Philadelphia, v. 27, n. 8, p. 61-65, Sep. 2012.

LEE, W. H. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite with different crystallinity: Effects on protein adsorption and release. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 100A, n. 6, p. 1539-1549, Jun. 2012.

LEGEROS, R. Z. **Calcium phosphates in oral biology and medicine**. New York: Karger, 1991.

LEGEROS, R. Z.; CRAIG, R. G. Strategies to affect bone remodeling - osteointegration. **Journal of Bone and Mineral Research**, Hoboken, v. 8, p. S583-S596, Dec. 1993.

- LIDWELL, O. M. et al. Effect of ultraclean air in operating-rooms on deep sepsis in the joint after total hip or knee replacement - a randomized study. **British Medical Journal**, London, v. 285, n. 6334, p. 10-14, 1982.
- LIN, K. L.; WU, C. T.; CHANG, J. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 10, n. 10, p. 4071-4102, Oct. 2014.
- LOO, S. C. J. et al. Synthesis and hydrothermal treatment of nanostructured hydroxyapatite of controllable sizes. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, New York, v. 19, n. 3, p. 1389-1397, Mar. 2008.
- LOPEZ, B. G. C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 119, n. 3, p. 677-687, Sep. 2015.
- LOPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 146, p. 174-180, Mar. 1 2014.
- MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 1, art. e0145954, Jan. 2016.
- MACHADO, C. S. et al. Comparative study of chemical composition and biological activity of yellow, green, brown, and red Brazilian propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, New York, art. 6057650, 2016.
- MALESEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrade, v. 72, n. 10, p. 921-939, 2007.
- MANNHEIMER W. **Microscopia dos materiais: uma introdução**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2002.
- MANUEL, C. M. et al. Preparation and characterization of calcium phosphate nanoparticles. **Key Engineering Materials**, Pfaffikon, v. 254, n. 2, p. 903-906, 2004.
- MARCUCCI, M. C. Propolis-chemical-composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.
- MARQUES, G. S. et al. Evaluation of procedure for spectrophotometric quantification of total flavonoids in leaves of *bauhinia forficata* link. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.
- MARTIN, J. G. P. et al. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina De Microbiologia**, Buenos Aires, v. 45, n. 2, p. 93-98, Apr-Jun, 2013.

MARYCZ, K. et al. Multifunctional nanocrystalline calcium phosphates loaded with Tetracycline antibiotic combined with human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 69, p. 17-26, Dec. 2016.

MCPHERSON, E. J. et al. Periprosthetic total hip infection - outcomes using a staging system. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 403, p. 8-15, Oct. 2002.

MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. **International Journal of Food Science and Technology**, Chichester, v. 47, n. 12, p. 2510-2518, Dec. 2012.

MENEGHELLI, C. et al. Southern Brazilian autumnal propolis shows anti-angiogenic activity: An in vitro and in vivo study. **Microvascular Research**, Maryland Heights, v. 88, p. 1-11, Jul. 2013.

MICROBIOENERGETICA. Disponível em:
<<http://microbioenergetica.squarespace.com/bacteriologa/2014/7/21/bacterias-gram-positivas>>. Acesso em: 24 nov. 2016.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 231-237, Apr. 2004.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, Muenchen, v. 152, n. 3, p. 239-246, Sep. 1997.

MIYATAKA, H. et al. Evaluation of propolis .1. evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 20, n. 5, p. 496-501, May. 1997.

NANDI, S. K. et al. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis - a review. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 29, n. 8, p. 2478-2485, Oct. 15 2009.

OKADA, M.; FURUZONO, T. Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, Bristol, v. 13, n. 6, Dec. 2012.

OLDONI, T. L. C. et al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, Kiflington, v. 77, n. 2, p. 208-213, Feb. 2011.

OLIVEIRA, R. N. et al. PVA hydrogels loaded with a Brazilian propolis for burn wound healing applications. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 132, n. 25, Jul. 2015.

ORÉFICE R. L.; PEREIRA M. M. ; MANSUR H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

PAGANOTTI, R. S. N.; REZENDE, J. D.; BARBEIRA, P. J. S. Discrimination between producing regions of Brazilian propolis by UV-VIS spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. **Current Analytical Chemistry**, Bussum, v. 10, n. 4, p. 537-544, 2014.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, Apr. 2002.

PEEL, T. N. et al. Cost analysis of debridement and retention for management of prosthetic joint infection. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 181-186, Feb. 2013.

PICCINELLI, A. L. et al. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 12, p. 6484-6491, Jun. 2011.

PIGHINELLI, L.; KUCHARSKA, M. Chitosan-hydroxyapatite composites. **Carbohydrate Polymers**, Kidlington, v. 93, n. 1, p. 256-262, Mar. 2013.

PLOUX, L. et al. New colloidal fabrication of bioceramics with controlled porosity for delivery of antibiotics. **Journal of Materials Science**, New York, v. 51, n. 19, p. 8861-8879, Oct. 2016.

PRICE, J. S. et al. Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 30, n. 3, p. 281-286, Mar. 1996.

RADOVANOVIC, Z. et al. Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag⁺ and Cu²⁺-doped biphasic hydroxyapatite/alpha-tricalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag⁺ and Cu²⁺-doped hydroxyapatite. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 307, p. 513-519, Jul. 2014.

RADOVANOVIC, Z. et al. Biocompatibility and antimicrobial activity of zinc(II)-doped hydroxyapatite, synthesized by a hydrothermal method. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrade, v. 77, n. 12, p. 1787-1798, 2012.

RATNER, B. D.; BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 6, p. 41-75, 2004.

RIGO, E. C. S. **Efeito das condições de precipitação sobre as características físico-químicas da hidroxiapatita**. 1995. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1995.

RIGO, E. C. S. et al. Alpha-tricalcium phosphate- and tetracalcium phosphate/dicalcium phosphate-based dual setting cements. **Latin American Applied Research**, Bahia Blanca, v. 37, n. 4, p. 267-274, Oct. 2007.

RISSING, J. P. Antimicrobial therapy for chronic osteomyelitis in adults: role of the quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 25, n. 6, p. 1327-1333, Dec. 1997.

ROCHA, B. A. et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Budapest, v. 108, n. 1, p. 87-94, Apr. 2012.

ROGERO, S. O. et al. Biocompatibility study of polymeric biomaterials. **Artificial Organs**, Hoboken, v. 27, n. 5, p. 424-427, May. 2003.

ROGINA, A. et al. In situ hydroxyapatite content affects the cell differentiation on porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds. **Annals of Biomedical Engineering**, New York, v. 44, n. 4, p. 1107-1119, Apr. 2016.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SAMANI, S. et al. In vitro antibacterial evaluation of sol-gel-derived Zn-, Ag-, and (Zn plus Ag)-doped hydroxyapatite coatings against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, Hoboken, v. 101, n. 1, p. 222-230, Jan. 2013.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology** Rio de Janeiro, v. 35, n. 1-2, p. 104-109, Jan-Jun. 2004.

SCHMIDT, E. M. et al. A Comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. **Biomed Research International**, New York, art. 257617, 2014a.

SCHMIDT, E. M. et al. Effect of extraction solvent on antiradical activity of the obtained propolis extracts. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 53, n. 1, p. 91-100, 2014b.

SEJAS, L.M. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003

SEWICK, A. et al. Does dual antibiotic prophylaxis better prevent surgical site infections in total joint arthroplasty? **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, v. 470, n. 10, p. 2702-2707, Oct. 2012.

SFORCIN, J. M. Biological properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 30, n. 6, p. 894-905, Jun. 2016.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 113, n. 1, p. 1-14, Aug. 2007.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 133, n. 2, p. 253-260, Jan. 2011.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, Nov. 2000.

SHARAF, S.; HIGAZY, A.; HEBEISH, A. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 59, p. 408-416, Aug. 2013.

SILVA, B. B. et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 5, n. 3, p. 313-316, Sep. 2008.

SILVA, L. N. et al. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. **Chemical Reviews**, Washington, v. 116, n. 16, p. 9162-9236, Aug. 2016.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, 2015.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SIMOES, L. M. C. et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 94, n. 1, p. 59-65, Sep. 2004.

SIMPSON, A. H. R. W.; DEAKIN, M.; LATHAM, J. M. Chronic osteomyelitis - the effect of the extent of surgical resection on infection-free survival. **Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume**, London, v. 83B, n. 3, p. 403-407, Apr. 2001.

SINGH, J. A. et al. Periprosthetic infections after shoulder hemiarthroplasty. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, Philadelphia, v. 21, n. 10, p. 1304-1309, Oct. 2012.

SINGH, S. Partial Oxidation of n-Pentane over Vanadium phosphorus oxide supported on hydroxyapatites. **South African Journal of Chemistry-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Chemie**, Pretoria, v. 69, p. 1-8, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 299, p. 152-178, 1999

SINGLETON, V. L.; ROSSI JUNIOR, J. A. Colometry of total Phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagentes. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 61, p. 695-702, Dec. 2016.

SMITH, A. J. et al. Failure rates of stemmed metal-on-metal hip replacements reply. **Lancet**, London, v. 380, n. 9837, p. 106-106, Jul. 2012.

SNEHA, M.; SUNDARAM, N. M. Preparation and characterization of an iron oxide-hydroxyapatite nanocomposite for potential bone cancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 10 Suppl 1, p. 99-106, 2015.

SORIANO-SOUZA, C. A. et al. Chlorhexidine-loaded hydroxyapatite microspheres as an antimicrobial delivery system and its effect on in vivo osteo-conductive properties. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, New York, v. 26, n. 4, Apr. 2015.

SRILAKSHMI, C.; SARAF, R. Ag-doped hydroxyapatite as efficient adsorbent for removal of Congo red dye from aqueous solution: synthesis, kinetic and equilibrium adsorption isotherm analysis. **Microporous and Mesoporous Materials**, Amsterdam, v. 219, p. 134-144, Jan 2016.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, Dec. 2007.

STANIC, V. et al. Synthesis, structural characterisation and antibacterial activity of Ag+-doped fluorapatite nanomaterials prepared by neutralization method. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 337, p. 72-80, May. 2015.

STANIC, V. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 256, n. 20, p. 6083-6089, Aug. 2010.

STRATTON, T. R. et al. Structure-activity relationships of antibacterial and biocompatible copolymers. **Biomacromolecules**, Washington, v. 11, n. 5, p. 1286-1290, May. 2010.

STRATTON, T. R.; RICKUS, J. L.; YOUNGBLOOD, J. P. In vitro biocompatibility studies of antibacterial quaternary polymers. **Biomacromolecules**, Washington, v. 10, n. 9, p. 2550-2555, Sep. 2009.

STRAVINSKAS, M. et al. Pharmacokinetics of gentamicin eluted from a regenerating bone graft substitute. **Bone & Joint Research**, London, v. 5, n. 9, p. 427-435, Sep. 2016.

SULEMAN, T. et al. Antimicrobial activity and chemometric modelling of South African propolis. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 119, n. 4, p. 981-990, Oct. 2015.

SUTJARITTANGTHAM, K. et al. Bactericidal effects of propolis/polylactic acid (PLA) nanofibres obtained via electrospinning. **Journal of Apicultural Research**, Abingdon, v. 53, n. 1, p. 109-115, 2014.

TANDE, A. J.; PATEL, R. Prosthetic joint infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, n. 2, p. 302-345, Apr. 2014.

TANK, K. P. et al. Pure and zinc doped nano-hydroxyapatite: synthesis, characterization, antimicrobial and hemolytic studies. **Journal of Crystal Growth**, Amsterdam, v. 401, p. 474-479, Sep. 2014.

TOMAZZOLI, M. M. et al. Discrimination of Brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-Vis scanning data. **Journal of Integrative Bioinformatics**, Bielefeld, v. 12, n. 4, art. 279, 2015.

TORETI, V. C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, 2013.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 3, n. 2, p. 249-254, Jun 2006.

TSUKAYAMA, D. T.; ESTRADA, R.; GUSTILO, R. B. Infection after total hip arthroplasty: a study of the treatment of one hundred and six infections. **Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume**, Needham, v. 78A, n. 4, p. 512-523, Apr. 1996.

UMTHONG, S. et al. In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 11, art. 37, May. 2011.

VALENTE, M. J. et al. Biological activities of portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 49, n. 1, p. 86-92, Jan. 2011.

VALENZUELA-BARRA, G. et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in region metropolitana de Santiago, Chile. **Journal of Ethnopharmacology**, Shannon, v. 168, p. 37-44, Jun. 2015.

VALLET-REGI, M. Ceramics for medical applications. **Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions**, Cambridge, n. 2, p. 97-108, 2001.

VALLET-REGI, M.; GONZALEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, Kidlington, v. 32, n. 1-2, p. 1-31, 2004.

VANHEGAN, I. S. et al. A financial analysis of revision hip arthroplasty: the economic burden in relation to the national tariff. **Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume**, London, v. 94B, n. 5, p. 619-623, May. 2012.

VICTORINO, F. R. et al. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 795-800, Oct-Dec. 2009.

VOLOSHIN, I. et al. Complications of total elbow replacement: a systematic review. **Journal of Shoulder and Elbow Surgery**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 158-168, Jan. 2011.

WANG, X. et al. Liquid-solid-solution synthesis of biomedical hydroxyapatite nanorods. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 18, n. 15, p. 2031, Aug. 2006.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical Infectious Diseases**, Carry, v. 39, n. 3, p. 309-317, Aug. 2004.

WOJTYCZKA, R. D. et al. In vitro antimicrobial activity of ethanolic extract of polish propolis against biofilm forming staphylococcus epidermidis strains. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2013, art. 590703, 2013.

XIE, Y. X. et al. Antibacterial Activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. **Current Medicinal Chemistry**, Bussum, v. 22, n. 1, p. 132-149, 2015.

YAN, Y. J. et al. Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO₂ nanotube composite coatings on titanium. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 314, p. 348-357, Sep. 2014.

YANG, S. J. et al. Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 94, p. 138-146, Oct. 2014.

YU, J. et al. Synthesis, characterization, antimicrobial activity and mechanism of a novel hydroxyapatite whisker/nano zinc oxide biomaterial. **Biomedical Materials**, Bristol, v. 10, n. 1, art. 015001, Feb. 2015.

ZHANG, B. P. et al. Mechanical properties, degradation performance and cytotoxicity of Mg-Zn-Ca biomedical alloys with different compositions. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 31, n. 8, p. 1667-1673, Dec. 2011.

ZHANG, C. Y. et al. Nano-alumina/hydroxyapatite composite powders prepared by in-situ chemical precipitation. **Ceramics International**, Kidlington, v. 42, n. 1, p. 279-285, Jan 2016.

ZHENG, Y. Z. et al. A theoretical study on the hydrogen-bonding interactions between flavonoids and ethanol/water. **Journal of Molecular Modeling**, Heidelberg, v. 22, n. 4, art. 95, Apr. 2016.

ZMISTOWSKI, B. et al. Prosthetic joint infection caused by gram-negative organisms. **Journal of Arthroplasty**, Philadelphia, v. 26, n. 6, p. 104-108, Sep. 2011.

ANEXO

Ficha padrão de difração para hidroxiapatita JPCDS 9-432

Pattern : 9432		Radiation = 1.540600		Quality : indexed																																																																																																																																																																																																																																																																																																
<div>Ca₂ (P O₄)₂ (OH)</div> <div>Hydroxylapatite, syn / Calcium Phosphate Hydroxide</div>		<table><thead><tr><th>2th</th><th>I</th><th>h</th><th>k</th><th>l</th></tr></thead><tbody><tr><td>10.820</td><td>12</td><td>1</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>16.842</td><td>8</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td></tr><tr><td>18.788</td><td>4</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td>21.820</td><td>10</td><td>2</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>22.902</td><td>10</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr><tr><td>25.354</td><td>2</td><td>2</td><td>0</td><td>1</td></tr><tr><td>25.879</td><td>40</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>28.127</td><td>12</td><td>1</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>28.997</td><td>18</td><td>2</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td>31.774</td><td>100</td><td>2</td><td>1</td><td>1</td></tr><tr><td>32.197</td><td>80</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td></tr><tr><td>32.902</td><td>80</td><td>3</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>34.049</td><td>25</td><td>2</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>35.491</td><td>6</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td></tr><tr><td>39.205</td><td>8</td><td>2</td><td>1</td><td>2</td></tr><tr><td>39.919</td><td>20</td><td>3</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td>40.453</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td><td>1</td></tr><tr><td>42.030</td><td>10</td><td>3</td><td>1</td><td>1</td></tr><tr><td>42.319</td><td>4</td><td>3</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>43.805</td><td>8</td><td>1</td><td>1</td><td>3</td></tr><tr><td>44.370</td><td>2</td><td>4</td><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>45.308</td><td>6</td><td>2</td><td>0</td><td>3</td></tr><tr><td>46.713</td><td>30</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td></tr><tr><td>48.104</td><td>16</td><td>3</td><td>1</td><td>2</td></tr><tr><td>48.624</td><td>6</td><td>3</td><td>2</td><td>0</td></tr><tr><td>49.489</td><td>40</td><td>2</td><td>1</td><td>3</td></tr><tr><td>50.494</td><td>20</td><td>3</td><td>2</td><td>1</td></tr><tr><td>51.285</td><td>12</td><td>4</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td>52.102</td><td>16</td><td>4</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>53.145</td><td>20</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td></tr><tr><td>54.442</td><td>4</td><td>1</td><td>0</td><td>4</td></tr><tr><td>55.881</td><td>10</td><td>3</td><td>2</td><td>2</td></tr><tr><td>57.129</td><td>8</td><td>3</td><td>1</td><td>3</td></tr><tr><td>58.075</td><td>4</td><td>5</td><td>0</td><td>1</td></tr><tr><td>59.940</td><td>6</td><td>4</td><td>2</td><td>0</td></tr><tr><td>60.459</td><td>6</td><td>3</td><td>3</td><td>1</td></tr><tr><td>61.882</td><td>10</td><td>2</td><td>1</td><td>4</td></tr><tr><td>63.013</td><td>12</td><td>5</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>63.444</td><td>4</td><td>5</td><td>1</td><td>0</td></tr><tr><td>64.090</td><td>13</td><td>3</td><td>0</td><td>4</td></tr><tr><td>64.090</td><td>13</td><td>3</td><td>2</td><td>3</td></tr><tr><td>65.033</td><td>9</td><td>5</td><td>1</td><td>1</td></tr><tr><td>66.398</td><td>4</td><td>4</td><td>2</td><td>2</td></tr><tr><td>66.398</td><td>4</td><td>4</td><td>1</td><td>3</td></tr><tr><td>69.701</td><td>3</td><td>5</td><td>1</td><td>2</td></tr><tr><td>71.853</td><td>5</td><td>4</td><td>3</td><td>1</td></tr><tr><td>71.853</td><td>5</td><td>4</td><td>0</td><td>4</td></tr><tr><td>72.289</td><td>4</td><td>5</td><td>2</td><td>0</td></tr><tr><td>72.289</td><td>4</td><td>2</td><td>0</td><td>5</td></tr><tr><td>73.997</td><td>7</td><td>4</td><td>2</td><td>3</td></tr><tr><td>75.025</td><td>3</td><td>3</td><td>2</td><td>4</td></tr><tr><td>75.025</td><td>3</td><td>6</td><td>0</td><td>2</td></tr><tr><td>75.588</td><td>9</td><td>2</td><td>1</td><td>5</td></tr><tr><td>76.158</td><td>1</td><td>4</td><td>3</td><td>2</td></tr><tr><td>77.177</td><td>11</td><td>5</td><td>1</td><td>3</td></tr><tr><td>78.230</td><td>9</td><td>5</td><td>2</td><td>2</td></tr></tbody></table>						2th	I	h	k	l	10.820	12	1	0	0	16.842	8	1	0	1	18.788	4	1	1	0	21.820	10	2	0	0	22.902	10	1	1	1	25.354	2	2	0	1	25.879	40	0	0	2	28.127	12	1	0	2	28.997	18	2	1	0	31.774	100	2	1	1	32.197	80	1	1	2	32.902	80	3	0	0	34.049	25	2	0	2	35.491	6	3	0	1	39.205	8	2	1	2	39.919	20	3	1	0	40.453	2	2	2	1	42.030	10	3	1	1	42.319	4	3	0	2	43.805	8	1	1	3	44.370	2	4	0	0	45.308	6	2	0	3	46.713	30	2	2	2	48.104	16	3	1	2	48.624	6	3	2	0	49.489	40	2	1	3	50.494	20	3	2	1	51.285	12	4	1	0	52.102	16	4	0	2	53.145	20	0	0	4	54.442	4	1	0	4	55.881	10	3	2	2	57.129	8	3	1	3	58.075	4	5	0	1	59.940	6	4	2	0	60.459	6	3	3	1	61.882	10	2	1	4	63.013	12	5	0	2	63.444	4	5	1	0	64.090	13	3	0	4	64.090	13	3	2	3	65.033	9	5	1	1	66.398	4	4	2	2	66.398	4	4	1	3	69.701	3	5	1	2	71.853	5	4	3	1	71.853	5	4	0	4	72.289	4	5	2	0	72.289	4	2	0	5	73.997	7	4	2	3	75.025	3	3	2	4	75.025	3	6	0	2	75.588	9	2	1	5	76.158	1	4	3	2	77.177	11	5	1	3	78.230	9	5	2	2
2th	I	h	k	l																																																																																																																																																																																																																																																																																																
10.820	12	1	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
16.842	8	1	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
18.788	4	1	1	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
21.820	10	2	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
22.902	10	1	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
25.354	2	2	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
25.879	40	0	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
28.127	12	1	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
28.997	18	2	1	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
31.774	100	2	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
32.197	80	1	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
32.902	80	3	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
34.049	25	2	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
35.491	6	3	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
39.205	8	2	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
39.919	20	3	1	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
40.453	2	2	2	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
42.030	10	3	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
42.319	4	3	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
43.805	8	1	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
44.370	2	4	0	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
45.308	6	2	0	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
46.713	30	2	2	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
48.104	16	3	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
48.624	6	3	2	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
49.489	40	2	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
50.494	20	3	2	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
51.285	12	4	1	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
52.102	16	4	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
53.145	20	0	0	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																
54.442	4	1	0	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																
55.881	10	3	2	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
57.129	8	3	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
58.075	4	5	0	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
59.940	6	4	2	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
60.459	6	3	3	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
61.882	10	2	1	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																
63.013	12	5	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
63.444	4	5	1	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
64.090	13	3	0	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																
64.090	13	3	2	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
65.033	9	5	1	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
66.398	4	4	2	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
66.398	4	4	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
69.701	3	5	1	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
71.853	5	4	3	1																																																																																																																																																																																																																																																																																																
71.853	5	4	0	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																
72.289	4	5	2	0																																																																																																																																																																																																																																																																																																
72.289	4	2	0	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																
73.997	7	4	2	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
75.025	3	3	2	4																																																																																																																																																																																																																																																																																																
75.025	3	6	0	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
75.588	9	2	1	5																																																																																																																																																																																																																																																																																																
76.158	1	4	3	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
77.177	11	5	1	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																
78.230	9	5	2	2																																																																																																																																																																																																																																																																																																
<div>Lattice : Hexagonal</div> <div>S.G. : P63/m (175)</div> <div>a = 941800</div> <div>c = 658400</div> <div>Z = 2</div>		<div>Mol. weight = 802.32</div> <div>Volume [CD] = 529.80</div> <div>Dx = 3.155</div> <div>Dm = 3.080</div>																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
<div>COLOR : Green, bluish green, yellow-green, grayish green, violet, violet-blue, violet, colorless, light greenish white, gray, brown, pinkish red, pinkish-red, blue</div> <div>GENERAL COMMENTS : <i>hkl</i> are peak values from a pattern which shows slight broadening of prism reflections.</div> <div>SAMPLE SOURCE OR LOCALITY : Sample obtained following the procedure indicated by Hodge et al., <i>Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.</i>, 10 158 (1938).</div> <div>GENERAL COMMENTS : Validated by calculated data 24-33.</div> <div>ADDITIONAL PATTERN : To replace 34-10.</div> <div>OPTICAL DATA : B=1.651, D=1.844, Sign=</div> <div>ADDITIONAL PATTERN : See ICSD 22059, 22060, 24240, 26204, 26205 and 34457 (PDF 73-293, 73-294, 73-1731, 74-565, 74-566 and 75-084).</div> <div>DATA COLLECTION FLAG: Ambient</div>																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
<div>CAS : 1308-08-5</div> <div>*ICDD Grant-In-Aid, primary reference : de Wolff, P., <i>Technisch Physische Dienst</i>, Delft, The Netherlands. *Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., volume 9, page 879, optical data :</div>																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
<div>Radiation : CuKα1</div> <div>Lambda : 1.54060</div> <div>SS/FOM : F20= 54(0.015835)</div>		<div>Filter : Not specified</div> <div>d-sp : Guinier</div>																																																																																																																																																																																																																																																																																																		