UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Atividades cicatrizante e antiúlcera de espécies vegetais brasileiras:

Atividade cicatrizante, fracionamento químico e análises de própolis verde.

Harry Léo Wysocki Júnior

Orientadora Prof^a Dr^a Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo

- 2013 -

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Harry Léo Wysocki Júnior

Atividades cicatrizante e antiúlcera de espécies vegetais brasileiras:

Atividade cicatrizante, fracionamento químico e análises de própolis verde.

Dissertação apresentada como
exigência do programa de
Pós-Graduação em Fármaco e
Medicamentos.

Orientadora Prof^a Dr^a Elfriede Marianne Bacchi

São Paulo

- 2013 -

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Wysocki Júnior, Harry Léo
W994a Atividades cicatrizante e antiúlceras de espécies brasileiras :
atividade cicatrizante, fracionamento químico e análise de própolis
verde / Harry Léo Wysocki Júnior. -- São Paulo, 2013.
92p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Bacchi, Elfriede Marianne

1. Insumos farmacêuticos 2. Propólis : Produtos naturais :
Farmacognosia I. T. II. Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.19 CDD

Harry Léo Wysocki Júnior

Atividades cicatrizante e antiúlcera de espécies vegetais brasileiras:

Atividade cicatrizante, fracionamento químico e análises de própolis verde.

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Elfriede Marianne Bacchi
Orientadora/presidente

1º. Examinador (a)

2º. Examinador (a)

3º. examinador (a)

São Paulo, _____ de _____.

Dedicatória

À Maria Amélia Dantas.

Agradecimentos

*Louvo e agradeço a Deus pela Vida, que me ensinou que fezes viram adubo, e que
diamantes, serão sempre diamantes!*

Agradeço com Ágape a Maria Amélia Dantas, minha mãe – água do meu mundo;

Agradeço com Eros a Karina, tucs;

Agradeço com Filos a Profª Drª Elfriede Marianne Bacchi, Tia Elfi , a que conduziu;

*Um grande agradecimento com Frater a um grande número de pessoas, e em
especial ao Dr. Honoris Causa Roberto Honório, técnico do laboratório de
Farmacognosia da FCF-USP, aos Professores, funcionários, a todos que contribuíram
em outros laboratórios, aos companheiros de laboratório, aos colegas da USP, e a todos
aqueles que nunca conheci, mas que de alguma forma colaboraram com este trabalho.*

Um agradecimento especial ao Sol, Luz infalível após cada noite escura!!!!

RESUMO

Wysocky Júnior, Harry Léo, **Atividades cicatrizante e antiúlcera de espécies vegetais brasileiras: Atividade cicatrizante, fracionamento químico e análises de própolis verde**. 2013. 92f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013

A atividade cicatrizante da própolis é historicamente descrita, porém ainda não foram conduzidos experimentos que descrevam a atividade cicatrizante de amostras de própolis verde e de suas frações. Própolis é uma resina coletada por abelhas do gênero *Apis* sp. para diversas finalidades. Fatores fitogeográficos influenciam a composição química das amostras e diversas espécies botânicas já foram identificadas como fonte de resina para a elaboração de própolis pelas abelhas, entre elas pode-se citar a espécie *B. dracunculifolia* DC como origem botânica da própolis verde. Como constituintes químicos deste tipo de amostra já foram relatados flavonóides, compostos fenólicos, ácidos graxos, etc. Na análise da amostra, feita por microscopia óptica, foram identificados fragmentos vegetais que comprovam a origem botânica da própolis como *B. dracunculifolia* DC. Após a obtenção, o extrato hidroetanólico bruto foi fracionado, usando-se solventes de polaridade crescente, obtendo-se assim três frações: hexânica, acetato de etila e hidroetanólica. Os perfis cromatográficos em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência demonstraram que houve um fracionamento químico satisfatório. O extrato hidroetanólico bruto e suas frações foram submetidos à quantificação de flavonóides totais, fenólicos totais, derivados do ácido p-cumárico, confirmando a distribuição de compostos em diferentes frações e em diferentes concentrações. Foi avaliada também a atividade antioxidante, antimicrobiana e, em ensaios *in vivo* em ratos, a cicatrização e a quantificação de neutrófilos e citocinas (CINC, L-Selectina, VGEF e TNF). O extrato bruto e as frações, até a concentração de 1mg/mL, não apresentaram atividade antimicrobiana frente os micro-organismos testados. Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos do ensaio de cicatrização, tampouco houve diferenças estatísticas entre a contagem de neutrófilos, mas foi possível delinear uma tendência de atividade anti-inflamatória nas frações hexânica e hidroetanólica.

Palavras Chaves: Própolis, fracionamento químico, cicatrização, citocinas, anti-inflamatório

ABSTRACT

Wysocky Junior, Harry Leo, **Healing and anti-ulcer activities of Brazilian plant species: Activity healing, fractionation and analysis of green propolis**. In 2013. 92F. Dissertation - Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo, São Paulo. 2013

The healing activity of propolis is historically described, but not yet experiments describing the healing activity of propolis samples and their fractions were conducted. Propolis is a resin collected by bees of the genus *Apis* sp. for several purposes. Phytogeographic factors influence the chemical composition of samples and various botanical species have been identified as a source of resin for the preparation of propolis by bees, among them we can mention the species *B. dracunculifolia* DC as botanical origin of propolis. As chemical constituents of such sample flavonoids, phenolic compounds, fatty acids, etc. have been reported. In the analysis of the sample taken by optical microscopy, plant fragments that prove the botanical origin of propolis were identified as *B. dracunculifolia* DC. The crude hydroethanolic extract was chemically fractionated using solvents of increasing polarity, thus obtaining three fractions: hexane, ethyl acetate and hydroethanol. The chromatographic profiles in thin-layer chromatography and high performance liquid chromatography were obtained and the chromatographic profiles showed that there was a satisfactory fractionation. The crude hydroethanolic extract and its fractions were subjected to quantification of total flavonoids, phenolic compounds, derivatives of p - coumaric acid, confirming the distribution of compounds in the different fractions at different concentrations. We also evaluated the antioxidant, antimicrobial and *in vivo* assays in rats, healing and quantification of neutrophils and cytokines (CINC , L- selectin , VEGF and TNF). The crude extract and the fractions until the concentration of 1mg/mL, showed no antimicrobial activity against the microorganisms tested. No statistically significant difference was observed between groups in the healing assay, there was also no statistical difference between the neutrophil count, but it was possible to delineate a trend of anti-inflammatory activity in hexane and hydroethanol fractions.

Key Words: Propolis, fractionation, wound healing, cytokines, anti-inflammatory

ÍNDICE

RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
Lista de figuras	11
Lista de tabelas.....	12
Lista de gráficos.....	13
Lista de abreviações.....	14
1. Introdução e justificativa.....	15
2. Revisão.....	15
2.1. Uso de produtos naturais.....	15
2.2. Própolis	16
2.3.1. Fonte botânica.....	18
2.3.2. Composição química	22
2.3.3. Farmacologia.....	24
2.3.4. Atividade cicatrizante.....	26
2.3.4.1. A pele e o processo de cicatrização	26
2.3.4.2. Atividade cicatrizante da própolis	28
3. Nanocápsulas	29
4. Objetivos.....	29
5. Materiais e Métodos.....	30
5.1. Amostras de própolis <i>in natura</i>	30
5.2. Análises físico-químicas	30
5.3. Análise microscópica da amostra de própolis	31
5.4. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico	31
5.5. Fracionamento químico da própolis.....	32
5.6. Triagem química.....	32

5.7. Perfil cromatográfico.....	33
5.8. Quantificação de flavonóides totais	34
5.9. Quantificação de Fenólicos Totais.....	35
5.10. Quantificação de derivados do ácido cinâmico	37
5.11. Atividade antioxidante	37
5.12. Atividade Antimicrobiana	39
5.13. Nanocápsulas.....	39
5.14. Estudos in vivo	40
5.14.1. Ensaios de cicatrização em ferida no dorso de animais.....	40
5.14.2. Quantificação de citocinas (TNF, L-Selectina, VGEF e CINC).....	42
5.15. Estatística.....	44
6. Resultados.....	44
6.1. Determinação do teor de cinzas	44
6.2. Perda por dessecação a 105°C.....	44
6.3. Análise microscópica.....	44
6.4. Fracionamento químico	45
6.5. Triagem química.....	46
6.6. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	47
6.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	48
6.7. Quantificação de flavonóides totais	50
6.8. Quantificação de fenólicos totais	51
6.9. Quantificação de derivados do ácido p-cumárico.....	52
6.10. Atividade antioxidante	55
6.11. Atividade antimicrobiana.....	57
6.12. Nanocápsulas.....	57
6.13. Cicatrização.....	58
6.13.2 Quantificação de neutrófilos	62

6.13.3 Quantificação de citocinas (CINC, L-Selectina, TNF e VEGF).....	67
7. Discussão	74
8. Conclusões	81
Referências	81
Anexos.....	91

Lista de figuras

Figura 1 - Abelha – hieróglifo em forma de abelha simbolizando o Faraó do baixo Egito.....	17
Figura 2 - Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepilin C®).....	32
Figura 3 – Local da incisão da ferida no dorso do rato	41
Figura 4 – Foto de análise microscópica de amostra de própolis	44
Figura 5 - Cromatoplaça de amostras de própolis.....	47
Figura 6 - Cromatoplaça de amostras de própolis – Fracionamento químico.....	47
Figura 7 - Cromatogramas do extrato bruto hidroetanólico e das frações	48
Figura 8 – Cromatogramas do extrato hidroetanólico bruto e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica – quantificação de derivados do ácido p-cumárico	51
Figura 9 – Figura representativa da média da quantificação de neutrófilos Grupo controle negativo.....	61
Figura 9 - Figura representativa da média da quantificação de neutrófilos Grupo controle positivo	62

Lista de tabelas

Tabela 1 – Rendimento (%) obtido do extrato bruto hidroetanólico e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.	45
Tabela 2 – Triagem fitoquímica do extrato hidroetanólico bruto.....	46
Tabela 3 –Quantificação de flavonoides totais no extrato hidroetanólico bruto e nas frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.....	49
Tabela 4 - Quantificação de fenólicos totais no extrato hidroetanólico bruto e nas frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.....	50
Tabela 5 - Quantificação de derivados do ácido p-cumárico no extrato hidroetanólico bruto e nas frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.....	53
Tabela 6 - Atividade antioxidante (IC ₅₀) no extrato hidroetanólico bruto e nas frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.....	55
Tabela 7 –Análise das nanocápsulas em função da concentração de extrato hidroetanólico bruto incorporado em 3 concentrações: 125, 250 e 500 µg/mL. Tamanho (nm) e polidispersão.....	56
Tabela 8 - Médias das áreas das feridas T= 24h, do extrato hidroetanólico bruto, das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica, da solução fisiológica e do controle branco.....	57
Tabela 9 - Médias das áreas das feridas T= 72h, do extrato hidroetanólico bruto, das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica, da solução fisiológica e do controle branco.....	57
Tabela 10 - Médias das áreas das feridas T= 6 dias, do extrato hidroetanólico bruto, das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica, da solução fisiológica e do controle branco.....	58
Tabela 11 - Médias das áreas das feridas T= 10 dias, do extrato hidroetanólico bruto, das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica, da solução fisiológica e do controle branco.....	59
Tabela 12 - Médias da contagem de neutrófilos, dos tratamentos controles negativos: PBS, extrato hidroetanólico bruto, fração hexânica, fração acetato de etila e fração hidroetanólica e tratamentos positivos: PBS+LPS, extrato hidroetanólico bruto+LPS, fração hexânica+LPS, fração acetato de etila+LPS e fração hidroetanólica+LPS.....	62
Tabela 13 - Comparação das médias da contagem de neutrófilos, dos tratamentos controles negativos (média dos tratamentos:PBS, extrato hidroetanólico bruto, fração hexânica, fração acetato de etila e fração hidroetanólica) com os tratamentos positivos (média dos tratamentos: PBS+LPS, extrato hidroetanólico bruto+LPS, fração hexânica+LPS, fração acetato de etila+LPS e fração hidroetanólica+LPS).....	64

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Quantificação de flavonoides. Curva de calibração de quercetina.....	49
Gráfico 2 - Quantificação de fenólicos. Curva de calibração de ácido gálico.....	50
Gráfico 3 - Quantificação de derivados do ácido p-cumárico. Curva de calibração de ácido p-cumárico.....	51
Gráfico 4 - Avaliação da atividade antioxidante, curva de calibração do Trolox®	54
Gráfico 5 - Dinâmica de fechamento das feridas.....	56
Gráfico 6 - Médias das áreas da lesão. T= 24h.....	57
Gráfico 7 - Médias das áreas da lesão. T= 72h.....	58
Gráfico 8 - Médias das áreas da lesão. T= 6dias.....	59
Gráfico 9 - Médias das áreas da lesão. T= 10dias.....	60
Gráfico 10- Contagem de neutrófilos, grupo controle negativo (PBS).....	63
Gráfico 11 - Contagem de neutrófilos, grupo controle positivo (PBS+LPS).....	63
Gráfico 12 - Comparação entre a contagem de neutrófilos entre os grupos controle positivos e negativos.....	64
Gráfico 13 - Quantificação de citocinas – citocina CINC. Curva de calibração de citocina CINC.....	65
Gráfico 14 - Quantificação de citocinas CINC – controles negativos.....	65
Gráfico 15 - Quantificação de citocinas CINC – controles positivos.....	65
Gráfico 16 - Quantificação de citocinas – citocina L-selectina. Resultados obtidos para a curva de calibração de citocina L-selectina.....	66
Gráfico 17 - Quantificação de citocinas L-Selectina – controles negativos.....	67
Gráfico 18 - Quantificação de citocinas L-Selectina – controles positivos.....	68
Gráfico 19 - Quantificação de citocinas – citocina L-selectina. Curva de calibração de citocina TNF.....	68
Gráfico 20 - Quantificação de citocinas TNF – controles positivos.....	69
Gráfico 21 - Quantificação de citocinas – citocina VGEF. Curva de calibração de citocina VGEF.....	69
Gráfico 12 - Quantificação de citocinas VGEF – controles negativos.....	69
Gráfico 18 - Quantificação de citocinas VGEF – controles positivos.....	71

Lista de abreviações

ANVISA	Agencia nacional de vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CAS	Chemical Abstracts Service
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDAE	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CI ₅₀	Concentração inibitória 50%
CINC	Citocina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DHCA	Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico
DMSO	Dimetil sulfoxido
DPPH	2,2'-difenil-1-picrilidrazila
EROs	Espécies reativas do oxigênio
EtOH	Etanol
FCF-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo
GL	Gay-Lussac
HIV	Vírus de imunodeficiência humano
ICAFE	Instituto de Ciências da Atividade Física e Esporte
IL	Interleucina
LC	Liquid cromathography
LPS	Lipopolissacarideo
MS	Espectrometria de massas
NO	óxido nítrico
NP-PEG	Natural Products (revelador)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA	Photodiode Array
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
Rt	Tempo de retenção
PBS	Tampão de fosfato salino (phosphate buffered saline)
P-CUM	Ácido p-cumárico
pH	Potencial hidrogeniônico
PHCA	Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico
PM	Peso molecular
TGF	Fator de crescimento transformante-alfa
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
UNICSUL	Universidade Cruzeiro do Sul
UV	Ultra Violeta
UV-VIS	Ultra Violeta - visível
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

1. Introdução e justificativa

Dentre os produtos apícolas, a própolis se destaca pelos inúmeros efeitos biológicos demonstrados. As pesquisas com própolis se intensificaram nas últimas décadas. Estudos sobre sua origem botânica, composição química e ensaios clínicos foram realizados, confirmando muitos dos efeitos biológicos atribuídos, além da elucidação de diversas moléculas que participam de sua composição química. Uma importante contribuição para o controle de qualidade é a padronização das amostras de própolis, com identificação de sua fonte botânica e marcadores químicos. Entretanto, muitos dos efeitos farmacológicos observados ainda não podem ser relacionados a moléculas ou classes de moléculas específicas, tampouco ao possível sinergismo existente entre estas diferentes classes de moléculas. O presente trabalho teve como objetivo fracionar quimicamente amostras de própolis verde e testar a atividade cicatrizante do extrato hidroetanólico bruto e das frações (hexânica, acetato de etila e hidroetanólica), monitorando o tempo de cicatrização, além disso, foi realizada a quantificação de flavonóides, fenólicos totais, derivados do ácido cinâmico, atividade antioxidante e antimicrobiana, obtenção de nanocápsulas, assim como a quantificação de neutrófilos e citocinas (CINC, L-selecitina, VGEF e TNF).

2. Revisão

2.1. Uso de produtos naturais

Mesmo com todos os avanços atuais da medicina e da farmacologia, ainda é intensa a procura de produtos de origem natural na busca de uma melhoria na qualidade de vida e na saúde dos seres humanos. Uma grande parcela da população mundial depende diretamente de produtos naturais para o alívio de diversas patologias (WHO, 1999).

Desde os primórdios da civilização, o ser humano busca alívio para diversos males na natureza que o cerca. As primeiras descrições sobre o uso de produtos naturais com fins medicinais datam da antiga Mesopotâmia, do Egito e da China. Durante a civilização grega, Hipócrates, o pai da medicina, utilizou a natureza como guia na escolha de seus remédios, e já aconselhava o uso da própolis para melhora do processo de cicatrização. Avicena em seu Cânone da Ciência Médica, também aconselha própolis para ferimentos causados por flechas.

A ação cicatrizante da própolis é conhecida há séculos. Os persas, gregos, romanos e incas já a utilizavam (CASTALDO e CAPASSO, 2002). Do ponto de vista etnofarmacológico, a própolis é um dos poucos medicamentos de fonte natural que vem sendo avidamente utilizado por um longo período de tempo por diferentes civilizações, do antigo Egito à atualidade (NUNES, 2009). O termo própolis já era descrito no século XVI na França e a Farmacopeia de Londres do século XVII a lista como droga oficial (MARCUCCI, 1996).

2.2. Própolis

O homem mantém desde longa data relação com as abelhas. Há evidências arqueológicas de mais de 15.000 anos (Cuevas das Arañas - Espanha) de coleta e uso de mel (CARNEIRO, 2005). Elas estão presentes nos hieróglifos egípcios, simbolizando o faraó do baixo Egito (OLIVEIRA, 2008), o que demonstra sua importância naquela civilização (FIGURA 1). Estão presentes também nos afrescos gregos e romanos, sendo Aristóteles, considerado o pai da apicultura, o primeiro homem a efetuar e registrar observações metódicas sobre as abelhas. É a ele que se deve a denominação da substância utilizada pelas abelhas para proteger a colmeia: própolis! A palavra própolis é derivada do grego *pro* - em favor, em defesa e *polis* - cidade ou comunidade, sendo uma tradução livre - em defesa da comunidade/colmeia.

Figura 1 - Abelha – hieróglifo em forma de abelha representando o Faraó do baixo Egito (Imagem: www.domescobras.blogspot.com).

Dentre os produtos provenientes das abelhas, utilizados pelo homem, pode-se citar o mel, o pólen e a geleia real, estes utilizados na alimentação humana, a cera – atualmente com amplo uso na indústria de cosméticos, a apitoxina e a própolis, esta última com o maior número de indicações para uso medicinal.

Para obtenção da própolis as abelhas fragmentam os ápices vegetativos das plantas (gemas, primórdios foliares e folhas jovens) com as mandíbulas, coletando as resinas liberadas. Com o primeiro par de patas transferem a massa de resina para as patas medianas e então para a corbícula (parte posterior da tíbia), nas patas posteriores (TEIXEIRA *et al*, 2005), transportando o material coletado para a colmeia.

A própolis é utilizada tanto por abelhas do gênero *Apis* como por meliponídeos (abelhas nativas, neste caso denominado geoprópolis) (NOGUEIRA NETO, 1997) para diversas finalidades (SIMONE-FINSTROM & SPIVAK, 2010). As abelhas a utilizam para proteger a colmeia, no reparo de frestas e no equilíbrio térmico, no preparo de locais assépticos e para o isolamento e mumificação de insetos e até mesmo pequenos mamíferos invasores (SIMONE-FINSTROM & SPIVAK, 2010; MARCUCCI, 1996).

O interesse pela própolis no Brasil é recente, sendo que muitas das obras editadas no país sobre apicultura na década de 70 e 80 do século passado, ou não citam a extração de própolis (CAMARGO, 1972; MELLO DE LIMA, 1979; MUXFELDT, 1985), ou colocam a substância como inconveniente dentro da apicultura racional (SCHEREN, 1984). Em contrapartida, existe no país

bibliografia de Masson (1984) e Breyer (1984), ambos ressaltando as propriedades da própolis desde o início da década de 1980, apresentando diversas aplicações medicinais, sendo que este último autor já demonstra preocupação quanto à padronização de amostras de própolis, sendo o primeiro a produzir comercialmente extratos de própolis no Brasil (década de 80 do século passado), ainda hoje comercializado com o mesmo nome (Propolina[®]).

O interesse global de pesquisas com própolis deve-se às suas características de panaceia. De certa maneira, estas características também dificultam sua aceitação, já que os médicos e outros profissionais tendem a desconfiar de sua eficácia, devido a lhe serem atribuídas dezenas de atividades biológicas simultaneamente (PEREIRA *et al.*, 2003).

Própolis [Chemical Abstracts Service (CAS) No. 9009-62-5] de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) é um material resinoso e balsâmico, coletado pelas abelhas de diversas partes vegetais como ramos, botões florais, ápices vegetativos, pólen e exsudatos resinosos, além do acréscimo pelas abelhas de secreções salivares e enzimas (BRASIL, 2001; LUSTOSA, 2007).

De modo geral, apresenta cerca de 50-60% de resinas e bálsamos, 20-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, aproximadamente 5% de grãos de pólen, detritos de madeira e terra e uma série de microelementos como: alumínio, sódio, zinco, silício, níquel, prata, cobre, potássio, magnésio, bário, cálcio, vanádio, estrôncio, ferro, cobalto, manganês, vitaminas – B1, B2, B6, C e E, além de aminoácidos diversos e alguns açúcares (WALKER & CRANE, 1987; MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005; SOUSA *et al.*, 2007), embora possa haver uma variação nestes valores, principalmente decorrente da origem botânica da própolis.

Alguns autores especulam que a sonoridade dos famosos violinos Stradivarius era em parte devida ao verniz utilizado, este tendo como base a própolis (MASSON, 1984).

2.3.1. Fonte botânica

A coloração da própolis pode variar em tonalidades de amarelo, marrom, verde, vermelho e preto. Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas sabe-se que elas são seletivas nesta coleta. Pontara e colaboradores (1997) sugeriram um componente genético que pode influenciar na preferência pela coleta, e há uma preocupação quanto à melhoria genética das abelhas, visando uma maior produção de própolis (MARTINEZ & SOARES, 2012). A composição da própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (MARCUCCI, 1996), ainda que amostras com uma mesma denominação possam apresentar diferença quanto à constituição química (SILVA *et al*, 2013). Sua composição também varia sazonalmente em uma mesma localidade (CASTRO *et al*, 2007). Como consequência desta composição química diferenciada, ocorre também uma variação nas suas atividades farmacológicas. Sua composição química é bem mais complexa nas regiões de clima tropical (CASTRO *et al*, 2007).

Estudos foram realizados com a intenção de elucidar quais seriam as plantas utilizadas pelas abelhas como fonte de substâncias para a elaboração da própolis. Alguns estudos visam o comportamento das abelhas e quais plantas visitam para a obtenção das resinas, enquanto outros procuram, através da análise microscópica, elementos na própolis que possam contribuir para a elucidação da fonte vegetal, outros tentam relacionar a composição química de amostras de própolis com exsudatos obtidos a partir de diversas plantas (OLIVEIRA *et al*, 1998; BUDEL *et al*, 2004; TEIXEIRA *et al*, 2005).

Análises palinológicas são utilizadas na tentativa de identificação da fonte botânica de amostras de própolis (BARTH, 1999; SANTANA, 2003; FREITAS *et al*, 2010; da SILVA *et al*, 2013), porém devido à grande quantidade de pólen coletado pelas abelhas, não é possível afirmar com certeza se tais amostras de pólen são originárias das mesmas fontes da própolis ou são apenas contaminações ocasionadas no interior da colmeia.

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia a fonte dominante de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.), embora resina também seja coletada em carvalhos (*Quercus* sp) e salgueiros (*Salix* sp) (OLIVEIRA *et al*, 1998), sendo fonte de resina *Populus suaveolens* na Mongólia, *P. nigra* e *P. canadensis* na Albânia, *P. nigra* na Bulgária, Grã-Bretanha, Hungria, Espanha e Turquia. Na Rússia a fonte de própolis é a *Betula verrucosa*, no Hawai são fontes de resina *Plumeria acutifolia* e *P. acuminata* enquanto na Austrália as abelhas utilizam *Xantorrea* sp. Na Venezuela as abelhas coletam resina de *Clusia minor* e *C. major*. Em Cuba as abelhas utilizam *Clusia nemorosa* para a elaboração da própolis. No Brasil, na região sudeste as abelhas coletam resinas principalmente de *Baccharis dracunculifolia* DC (SILVA, 2008; TEIXEIRA *et al*, 2005; FREIRE, 2000; FURNARI e FERRO, 2006) sendo esta a origem botânica da própolis verde. Uma própolis proveniente de Minas Gerais, com coloração preta teve sua origem relacionada com *Vernonia rubriramea* (FREIRE *et al*, 2000).

Park e colaboradores (2000) classificaram 12 tipos de própolis brasileira, de acordo com sua origem botânica, composição química e características físico-químicas, segundo o perfil químico obtido pelas técnicas de espectrometria de absorção na região UV-visível, CCDAE (Cromatografia em camada delgada de alta eficiência) e CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência), além da avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante, sendo que este número pode estar subestimado (SILVA, 2008). A própolis vermelha foi classificada como o 13º tipo (PARK, 2006; LUSTOSA, 2007), sendo sua origem botânica *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Leguminosae) (NUNES, 2009, LUSTOSA, 2007; DAUGSH *et al*, 2006; PARK, 2006).

Marcucci (2000) também desenvolveu um sistema de padronização, classificação e tipificação de amostras de própolis brasileiras baseado em marcadores químicos, sendo o Brasil o único país do mundo que conta com um sistema de tipificação de amostras de própolis.

Amostras de própolis verde provenientes de diversas localidades tiveram sua origem botânica relacionada a *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-

campo), família Asteraceae. (SILVA *et al*, 2013; SALATINO *et al*, 2010; TEIXEIRA *et al*, 2005).

Baccharis dracunculifolia: *Baccharis* é um importante gênero pertencente à família Asteraceae e à tribo Astereae e possui aproximadamente 500 espécies distribuídas principalmente na região Sudoeste e Sul do Brasil, estendendo-se até a Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia. As folhas são simples, inteiras, alternas, sésseis, uninérveas, verdes e membranáceas e medem 10-30mm de comprimento e 3-4mm de largura. Possuem consistência herbácea, coloração verde-escura, forma lanceolada. As folhas são completas, peninérveas que possuem bordos inteiros com porções denteadas. Apresentam formato lanceolado, ápice agudo, base atenuada e nervura mediana aparente na face abaxial. A lâmina foliar apresenta epiderme uniestratificada, cujas células possuem formato poligonal com parede relativamente delgada e são revestidas por cutícula delgada e estriada. A folha mostra estômatos do tipo anomocítico em ambas as faces, sendo caracterizada como anfiestomática e estes se localizam no mesmo nível ou ligeiramente acima das demais células epidérmicas. Tricomas glandulares pluricelulares, uni e bisseriados, com porção apical arredondada, reunidos pela base em tufo, são observados nas duas faces e se inserem em pequenas depressões (BUDEL *et al*, 2004; TEIXEIRA *et al*, 2005; PEGORINI *et al*, 2008).

A distribuição de *B. dracunculifolia* no estado de São Paulo é historicamente descrita por naturalistas que percorreram o país nos séculos XVIII e XIX com um curioso relato da intensa presença de alecrim do campo nos arredores do Morro do Jaraguá - SP feito por Auguste de Saint-Hilaire em 1819 (Saint-Hilaire, 1976).

No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizadas na região sudeste do país. Estima-se em 100 as espécies na Argentina, 28 no México e cerca de 40 na Colômbia, constituindo um dos mais importantes grupos de plantas neste país, das quais 38% são endêmicas (VERDI *et al*, 2005).

O estudo de espécies do gênero *Baccharis* ~~sp.~~ tem apresentado grandes avanços. Sua análise fitoquímica destaca a ocorrência de flavonóides, diterpenos e triterpenos, sendo observado maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos (VERDI *et al*, 2005). Os flavonóides apresentam-se normalmente como agliconas livres e muito raramente na forma glicosilada, o que é uma característica da família Asteraceae (VERDI *et al*, 2005), embora Nagatani e colaboradores (2001) tenham descrito a presença de alguns flavonóides glicosilados em *B. dracunculifolia*.

A composição química do óleo essencial de *B. dracunculifolia* é bem conhecida desde a década de 90 do século passado (LOAYZA *et al*, 1995), visto seu amplo uso na indústria de perfumaria (AGOSTINI *et al*, 2005).

2.3.2. Composição química

Mais de 300 substâncias já foram identificadas em amostras de própolis (SILVA FROZZA *et al*, 2013; SILVA *et al*, 2012; FURNARI e FERRO, 2006; MARCUCCI, 1996). Há grande dificuldade em padronizar sua composição química, uma vez que fatores geográficos, sazonais e climáticos exercem influência sobre as plantas, que são fontes da própolis (BANKOVA, 2005). Diversos grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para a determinação de marcadores químicos característicos e impressões digitais das diferentes amostras de própolis, relacionando-os com sua origem botânica. Ao trabalhar com amostras de própolis padronizadas, pode-se associar um tipo químico de própolis a uma determinada atividade biológica (SFORCIN & BANKOVA, 2011; SILVA, 2008).

Ainda que não tenha sido completamente definida, a composição química de amostras de própolis inclui ácidos graxos e fenólicos (incluindo ácido cinâmico e caféico) e seus ésteres, aldeídos aromáticos, álcoois, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, naftalenos e flavonóides (FARNESI, 2007; MARCUCCI, 1996).

Dentre os principais componentes químicos da própolis verde, pode-se citar os fenilpropanóides prenilados, que são ácidos fenólicos contendo um ou mais grupos prenila formados a partir do ácido cinâmico e seus derivados (ácido p-cumárico, ferúlico, caféico e sinápico) (SILVA *et al*, 2013; RIGHI, 2008; SILVA 2008), além de hidrocarbonetos (NEGRI *et al*, 1998) e ácidos cafeoilquínicos (MARCUCCI, 2006). Uma substância denominada Artepillin C[®] (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (FIGURA 2) é usada como marcador químico deste tipo de amostra de própolis (MATSUDA, 2008; FONSECA, 2007; SILVA, 2008; ALENCAR *et al*, 2005).

Figura 2 - ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C[®])
Um dos principais marcadores químicos da própolis verde.

Os flavonóides também são um grupo importante na constituição da própolis, sendo sua quantificação um dos critérios adotados para avaliação de amostras de própolis pelas agências reguladoras (BRASIL, 2001).

Diversas metodologias estão sendo utilizadas com a finalidade de uma identificação mais precisa das amostras, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ZHOU *et al*, 2008; NASCIMENTO *et al*, 2008; SOUZA *et al*, 2007; FURNARI e FERRO 2006), CLAE acoplada com outras técnicas, entre elas, espectrometria de massas (GARDANA *et al*, 2007; SAWAYA, 2006; VOLPI e BERGONZINI, 2006; CHANG *et al*, 2005; PIETA *et al*, 2002; MIDORIKAWA *et al*, 2001).

A caracterização de amostras também tem sido efetuada por cromatografia a gás (CG) acoplada à espectrometria de massas (CHANG *et al*, 2008; NASCIMENTO *et al*, 2008; TEIXEIRA *et al*, 2005) além de ESI(+)-MS e tandem ESI(+)-MS/MS (SILVA FROZZA *et al*, 2013).

2.3.3. Atividades biológicas e farmacológicas

A atividade da própolis deve-se a diversos e diferentes compostos (BANSKOTA *et al.*, 2001).

São descritas inúmeras atividades biológicas para amostras de própolis (SFORCIN & BANKOVA, 2011). A atividade anti-inflamatória seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos (MENEZES, 2005). Tem sido relatado também que a própolis possui atividade anti-inflamatória, por inibir a liberação de ácido araquidônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas ciclo-oxigenase-1 (COX-1), ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e lipo-oxigenase (LOX) (LUSTOSA, 2007).

A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou através de supressão de elementos do sistema imunológico. Atualmente, a utilização de própolis como uma substância imunomoduladora tem sido considerada uma alternativa para a prevenção e cura de diversas enfermidades (SFORCIN & BANKOVA, 2011; FISCHER *et al*, 2008).

Ainda de acordo com Fischer e colaboradores (2008), uma das formas de imunomodulação pela própolis ocorre através da ativação de macrófagos. A atividade imunomoduladora da própolis também pode ser observada através do incremento das respostas imune celular e humoral.

Estudos dirigidos à busca de soluções no tratamento do câncer colocaram os flavonóides e compostos fenólicos da própolis como elementos muito importantes na prevenção e inclusive na luta contra alguns tipos de neoplasias. (SFORCIN & BANKOVA, 2011; PARK *et al*, 2000). Este último autor observa uma modificação da atividade de alguns tipos do Citocromo P (CYP), que poderiam

estar envolvidos no metabolismo de carcinógenos, como a CYP1A1/1A2 e a CYP2B1/2B2, diminuindo a atividade destas isoformas, evitando assim a bioativação de carcinógenos como o benzo[α]pireno e a dietilnitrosamida. Banskota e colaboradores (2001) relatam a atividade antitumoral sobre diversos tipos de células tumorais.

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas nas células, em consequência de reações químicas oxidativas, desempenhando importantes funções biológicas no organismo. No entanto, podem ser prejudiciais em condições anormais (inflamação, fatores externos), causando diversos danos ao organismo (PIETTA, 2000). A ocorrência de diversas doenças está relacionada a aumentos nos níveis de radicais livres no organismo. A atividade antioxidante foi observada em própolis provenientes de diversas localidades, demonstrando significada atividade varredora de radicais livres (SILVA FROZZA *et al*, 2013; OLDONI, 2007; RUSSO *et al*, 2002; BANSKOTA *et al*, 2001).

A própolis apresenta atividade antimicrobiana frente a uma série de micro-organismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre outros (BISPO *et al*, 2012; SILVA *et al*, 2012; DE VARGAS *et al*, 2004; GONSALES *et al*, 2006; POPOV, 1998; FERNANDES JR *et al*, 1997; FERNANDES JR *et al*, 1995; GRANGE *et al*, 1990). A atividade antibacteriana apresentada pela própolis é mais pronunciada em bactérias Gram-positivas quando comparadas a bactérias Gram-negativas (SILVA *et al*, 2012; DE VARGAS *et al*, 2004; GONSALES *et al*, 2006). Amostras de própolis apresentam atividade antibacteriana independente da origem da amostra (SILVA *et al*, 2012; GONSALES *et al*, 2006; KUJUMGIEV *et al*, 1999). Também foi observada atividade frente a bactérias fitopatogênicas (BIANCHINI e BEDENDO, 1998)

A atividade antimicrobiana relacionada à própolis pode também estar associada às classes dos flavonóides, com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição da RNA-polimerase bacteriana (SILVA *et al*, 2012). Outros componentes além dos flavonóides, como os derivados do ácido cafeico, ácido benzóico e ácido cumárico (SALOMÃO *et al*, 2007), provavelmente agem

na membrana ou parede celular do micro-organismo, causando danos funcionais e estruturais (LUSTOSA, 2007); entretanto, Banskota (2001) e Castaldo e Capasso (2002) também atribuem a atividade antimicrobiana da própolis a moléculas da classe dos terpenos.

A atividade antifúngica da própolis foi demonstrada por diversos autores, principalmente contra *Candida* sp. (FERNANDES e COSTA, 2007; KUJUMGIEV *et al*, 1999; FERNANDES JR *et al*, 1997; FERNANDES JR *et al*, 1995; GRANGE *et al*, 1990), embora exista conflito em relação aos resultados dos dados apresentados entre os autores. Vale ressaltar que é comum amostras de própolis *in natura* apresentarem desenvolvimento fúngico (bolor).

A atividade antiviral também foi descrita por alguns autores entre eles, Marcucci (1995,1996), Kujumgiev e colaboradores (1999) e Park e colaboradores (2000). Marcucci (1995) mencionou a ação virucida nos vírus do herpes simples (HSV) e da estomatite vesicular (VSV). Estudos *in vitro* sugerem uma potente atividade seletiva antiviral contra as variantes X4 e R5 do HIV-1 (PARK *et al*, 2000; LUSTOSA, 2007); já Kujumgiev e colaboradores (1999) referem-se à atividade contra Influenza A.

2.3.4. Atividade cicatrizante

2.3.4.1. A pele e o processo de cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo, responsável pelo seu revestimento e sua delimitação. É composta por 3 camadas: epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo, sendo a epiderme a camada externa, sem vascularização, formada por várias camadas de células. A pele tem como função principal a proteção do organismo. A epiderme impede a penetração de micro-organismos ou substâncias químicas destrutivas e previne a perda de fluidos e eletrólitos. A derme é uma camada intermediária, constituída por tecido fibroso e fibras de colágeno, reticulares e elásticas. Nela se situam os vasos, os nervos e os anexos cutâneos (glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos). A hipoderme é formada por

tecido conjuntivo frouxo, tendo como função principal o depósito nutritivo de reserva, funcionando como isolante térmico e proteção mecânica, facilitando a mobilidade da pele em relação às estruturas adjacentes (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 1999).

Um ferimento ou ferida é uma lesão corporal física que resulta no rompimento da continuidade normal da estrutura cutânea. Cicatrização é o termo utilizado para definir o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado. O processo de cicatrização envolve componentes da matriz extracelular, células residentes (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células nervosas), leucócitos (neutrófilos, macrófagos/monócitos, linfócitos), assim como mediadores de natureza lipídica (prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária) e protéica (citocinas e fatores de crescimento) (HATANAKA & CURI, 2007).

A cicatrização de feridas divide-se em quatro principais eventos: I – Coagulação, II - Inflamação, III - Formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e IV - Remodelamento. O reparo tecidual apresenta uma fina regulação dependente de sinalização específica desencadeada por diversos tipos celulares, podendo ser modulado por diversas substâncias (HATANAKA & CURI, 2007).

A fase inflamatória ocorre nas primeiras horas após a lesão. A inflamação, gerada a partir da ruptura de tecidos deve ter fase curta e autolimitada uma vez que inflamação crônica prejudica o processo de reparo tecidual.

Após a lesão tecidual plaquetas e mastócitos liberam mediadores químicos inicialmente que provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia dos neutrófilos que tem como função combater os agentes invasores e realizar a fagocitose de debris celulares. Neutrófilos são importantes para a produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Essas células estão envolvidas na cicatrização, pois também produzem fatores de crescimento e citocinas, responsáveis pela recomposição.

A produção de citocinas inflamatórias como, por exemplo: interleucina 1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ocorre rapidamente após o trauma. Estas medeiam os sintomas da fase inflamatória (calor, rubor, tumor e dor). A fase inflamatória também é controlada por de quimiocinas como as proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP).

Embora a resposta mediada por citocinas seja parte essencial para a cicatrização, a sua produção em excesso está associada com a cronicidade da ferida.

2.3.4.2. Atividade cicatrizante da própolis

A atividade cicatrizante da própolis já foi demonstrada clinicamente por diversos autores: Pontara e colaboradores (1997), Dos Santos e colaboradores (2003), Rahal e colaboradores (2003), Segundo e colaboradores (2007) e Barbosa e colaboradores (2009).

Clinicamente a capacidade cicatrizante da própolis não difere estatisticamente daquela de *Aloe vera*, conhecida planta com potente atividade cicatrizante (SEGUNDO *et al*, 2007), e apresenta-se mais eficaz quando comparada a sulfadiazina de prata, fármaco amplamente utilizado para tratamentos de queimaduras (GREGORY *et al*, 2002). Os flavonóides são compostos que participam ativamente do processo de cicatrização, diminuindo o tempo de cicatrização (VIEIRA *et al*, 2008; ACAMPORA *et al*, 2007).

Atualmente, estudos químicos da própolis já elucidaram parte de sua constituição química e estudos clínicos demonstraram sua capacidade cicatrizante, mas até o presente momento não existe trabalho que tente relacionar a atividade cicatrizante com os constituintes químicos presentes em amostras de própolis. O estudo das frações químicas obtidas (hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica) nos ensaios de cicatrização pode elucidar a participação das diferentes classes de compostos químicos presentes na própolis e envolvidos na melhoria do processo reparo tecidual.

3. Nanocápsulas

Nanocápsulas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a 1µm, são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco/ativo estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Tem como principal vantagem a possibilidade de uma liberação controlada do ativo, otimizando seus efeitos, além de proporcionar uma melhor estabilidade físico-química, sendo um carreador adequado para muitas substâncias.

A caracterização das suspensões engloba a avaliação morfológica, a distribuição de tamanho de partícula, a determinação do potencial zeta, a determinação da quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco e, ainda, a avaliação da estabilidade em função do tempo de armazenamento.

4. Objetivos

É objetivo geral do presente estudo a comprovação da atividade cicatrizante de própolis, visando à identificação de suas frações com maior importância no processo de cicatrização e de seus principais compostos ativos.

Como objetivos específicos:

- ✓ Determinação de teor de cinzas, umidade (perda por dessecação a 105°C) de própolis *in natura*.
- ✓ Análise microscópica das amostras de própolis;
- ✓ Obtenção do extrato hidroetanólico das amostras de própolis;
- ✓ Fracionamento químico do extrato bruto hidroetanólico de própolis por solventes;
- ✓ Triagem química;

- ✓ Quantificação de flavonóides totais;
- ✓ Quantificação de fenólicos totais;
- ✓ Quantificação de derivados do ácido cinâmico;
- ✓ Atividade antioxidante do extrato e das frações;
- ✓ Obtenção do perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato e das frações;
- ✓ Atividade antimicrobiana
- ✓ Estudos *in vivo* no ensaio de ferida aberta: Verificação da atividade cicatrizante dos extratos e das frações. Análise macroscópica do processo de cicatrização;
- ✓ Ensaios *in vivo* para a quantificação de neutrófilos e de citocinas (CINC, L-selectina, VGEF e TNF);
- ✓ Obtenção de nanocápsulas do extrato hidroetanólico bruto de própolis.

5. Materiais e Métodos

5.1. Amostras de própolis *in natura*

A própolis verde *in natura* (500g) foi fornecida pelo Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, e produzida na região de Bambuí, Minas Gerais.

5.2. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), conforme descrito a seguir:

Determinação do teor de cinzas: 1g de amostra de própolis *in natura* pulverizada foi acondicionada em cadinho de porcelana com peso conhecido, o conjunto foi colocado sobre placa de aquecimento a 350°C, em capela de exaustão, até que não houvesse mais fumaça. Em seguida o conjunto foi acomodado em mufla a 600°C, onde permaneceu até que as cinzas se apresentassem totalmente brancas. O conjunto foi resfriado e pesado. A análise foi realizada em triplicata e o teor de cinzas calculado pela razão entre a massa de cinzas e a massa inicial de própolis, em porcentagem.

Perda por dessecação a 105°C: 1g de própolis bruta e pulverizada foi acondicionada em cadinho de porcelana com peso conhecido. O conjunto foi aquecido em estufa por 3h a 105°C. Após resfriado, o material foi pesado. A análise foi realizada em triplicata e o valor foi calculado pela razão entre a massa do material volatilizado e a massa inicial de própolis, em porcentagem.

5.3. Análise microscópica da amostra de própolis

A caracterização dos fragmentos dos órgãos vegetais presentes na própolis foi realizada em lâminas preparadas com as amostras de própolis *in natura*, após extração exaustiva com etanol 80 °GL; o resíduo sólido obtido após evaporação do solvente foi diafanizado em solução de água: hipoclorito de sódio (1:1) e lavado com água destilada em abundância. Em seguida, foi corado em solução de azul de Astra, lavado com água destilada, corado em safranina e lavado com água destilada novamente (OLIVEIRA e AKISUE, 2009). Posteriormente, o pó foi colocado em lâminas de vidro com lamínula e analisado com o auxílio de microscópio Olympus® com aumento de 40x. Os resultados foram documentados empregando-se as mesmas condições de observação, com auxílio de máquina fotográfica Olympus® FE230. Os dados obtidos foram comparados com dados disponíveis na literatura.

5.4. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico

O material (300g) foi triturado e pulverizado, sendo em seguida submetido à maceração por 48 horas em etanol 70% (1000mL) obtendo-se o extrato bruto hidroetanólico. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida (500mm/Hg⁻¹) com temperatura de 40°C, sendo em seguida liofilizado.

5.5. Fracionamento químico da própolis

Inicialmente amostras de própolis *in natura* foram submetidas à extração com solventes de polaridades crescentes, obtendo-se 5 frações: hexânica, diclorometânica, acetato de etila, etanólica e hidroetanólica 50%. Após a análise cromatográfica destas frações, repetiu-se o fracionamento, desta vez com os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e etanol 50% (ABREU MATOS, 1997). Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e em temperatura de 40°C. A fração hidroetanólica, após retirada do álcool, foi liofilizada. Após a avaliação dos resultados obtidos na CLAE, o extrato bruto hidroetanólico foi liofilizado (50g) e posteriormente fracionado com hexano (1x 500mL+1x 300mL), acetato de etila (1x 500mL+1x 300mL), e etanol/água 50% (1x 500mL), não havendo resíduo insolúvel após a última extração. As frações obtidas (hexânica, acetato de etila e hidroetanólica) foram concentradas em evaporador rotativo (-500mm/Hg e 40°C). A fração hidroetanólica foi liofilizada, após retirada do etanol em evaporador rotativo.

5.6. Triagem química

Foram feitos testes químicos para os principais grupos de moléculas de interesse (SIMÕES *et al*, 2010; ABREU MATOS, 1997; COSTA, 1994) no extrato hidroetanólico, sendo (a) Cumarinas: Visualização em solução alcalina com aparecimento de coloração amarela, e visualização do extrato sob a luz UV (fluorescência azul ou verde) (SIMÕES *et al*, 2010); (b) Polifenóis: reação com cloreto férrico (FeCl₃) (SIMÕES *et al*, 2010); (c) Flavonóides: cianidina (Shinoda), cloreto de alumínio e hidróxido de sódio (COSTA, 1994); (d) Taninos: acetato de

chumbo, acetato de cobre, alcalóides, reação com FeCl_3 (cor azul indica provavelmente taninos hidrolisáveis e verde, condensados) (COSTA, 1994; SIMÕES *et al*, 2010); (e) Antraquinonas: reação de Borntraeger (COSTA, 1994); (f) Alcalóides: reação com reativo de Dragendorff, Bertrand, Mayer, Bouchardat (COSTA, 1994); (g) Terpenos e esteróis: Reação de Liebermann-Burchard (SIMÕES *et al*, 2010); (h) Saponinas: verificada pelo teste de espuma (COSTA, 1994).

5.7. Perfil cromatográfico

O extrato e as frações obtidas foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo a fase estacionária sílica gel 60G Merck art 7731, com as seguintes fases móveis e reveladores utilizados;

Fase móvel 1 – Tolueno/clorofórmio/acetona (45:25:35)

Fase móvel 2 – Hexano/acetato de etila/ácido acético (60:40:3)

Fase móvel 3 – Tolueno/metiletilcetona/ácido acético (18:5:1)

Fase móvel 4 - Acetato de etila/ácido acético/ácido fórmico/ H_2O (100:11:11:26)

Fase móvel 5 - Tolueno/formiato de etila/ácido fórmico (50:40:10)

Fase móvel 6 – Clorofórmio/metanol (9:1)

Como reveladores foram utilizados: anisaldeído sulfúrico, NP-PEG (difenilboriloxietilamina 1,0 % em metanol + solução de polietilenoglicol 4000 - 5,0 %), cloreto férrico 2 %, ácido sulfúrico 10%, manchas visíveis e UV em comprimento de onda de 366 e 254 nm (WAGNER & BLADT, 2001)

Foram comparadas por CCD seis amostras comerciais com a amostra utilizada nos experimentos, sendo que das amostras comerciais quatro apresentavam-se na forma *in natura* e duas como extratos hidroetanólicos. Aquelas *in natura* foram maceradas em etanol 70°GL, 30 %m/V.

O perfil por CLAE foi determinado em equipamento Shimadzu[®] LC-20A, detector PDA (Photodiode Array). Todas as amostras foram analisadas na concentração de 1 mg/mL. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Shimadzu[®] C-18, modelo Shim-Pack CLC-ODS (M), com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm, como fase móvel o sistema gradiente de água Mili-Q[®] e ácido acético (19:1) (A)/Metanol (B), iniciando com 70% A e 30% B; 60% A e 40% B em 15 min; 50% A e 50% B em 30 min; 40% A e 60% B em 45 min; 25% A e 75% B em 65 min; 25% A e 75% B em 85 min; 10% A e 90% B em 95 min; 70% A e 30% B em 105 min; 70% A e 30% B em 115 min; sob fluxo de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL (FURNARI e FERRO, 2006)

5.8. Quantificação de flavonóides totais

A metodologia utilizada para a quantificação dos flavonóides é baseada na propriedade do cátion alumínio se complexar com os flavonóides, causando um deslocamento e uma intensificação da absorção (KOSALEC *et al*, 2005), é um método espectrofotométrico baseado na formação de complexos entre os íons alumínio (Al^{3+}) e os grupos carbonílicos e hidroxílicos dos flavonóis.

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Microplate Synergy Biotec em microplacas com 96 poços (Fisher Scientific, Hanover Park. IL, 96 poços, 200 uL). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

Previamente, uma solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) foi obtida pela dissolução de 80 mg de cloreto de alumínio em 2 mL de H_2O destilada, resultando em uma solução a 40 mg/mL. Também foi preparada uma solução de acetato de sódio na concentração de 32,8 mg/mL.

Inicialmente uma curva padrão de quercetina foi tomada como referência. A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de 300, 250, 200, 150, 100, 50 µg/mL de quercetina, utilizando como solvente etanol 80°GL, os resultados finais são expressos em flavonóides totais equivalentes a quercetina.

Para a curva de calibração, em microplacas, foram adicionados em cada poço 120 µL de água, 60 µL de etanol, 10 µL de cloreto de alumínio, 10 µL de acetato de sódio e 20 µL da solução de quercetina nas concentrações obtidas acima. Transcorridos 30 minutos, a leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 427 nm. O branco foi obtido substituindo-se a amostra por H₂O, em igual volume.

Para a quantificação dos flavonóides totais no extrato bruto hidroetanólico e nas frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica foram preparadas soluções a partir de dissolução de 500 µg de cada amostra em 1 mL de etanol 80°GL. Nas microplacas, foram adicionados em cada poço 120 µL de água, 60 µL de etanol, 10 µL de cloreto de alumínio, 10 µL de acetato de sódio e 20 µL da solução das amostras obtidas anteriormente. Após o tempo de 30 minutos a leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 427 nm.

Desta forma, foi possível determinar a quantidade de flavonóides na amostra, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente a dos ácidos fenólicos (FURNARI e FERRO, 2006), que apresentam absorbância em outros comprimentos de onda (MARCUCCI *et al*, 1998).

5.9. Quantificação de fenólicos totais

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Microplate Synergy Biotec em microplacas com 96 poços (Fisher Scientific, Hanover Park. IL, 96 poços, 200uL). Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na transferência de elétrons em meio alcalino de compostos fenólicos para complexos ácidos

fosfotúngico/fosfomolibdênico para a formação de complexos azuis determinados espectrofotometricamente em 760nm (AINSWORTH & GILESPIE, 2007).

Previamente obteve-se a solução de Folin 0,4N, pela diluição de 1 mL da solução estoque de Folin 2N em 4mL de H₂O destilada, e uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 700 mM, obtida pela dissolução de 18,55g de carbonato de sódio em 250 mL de H₂O destilada.

Inicialmente uma curva padrão de calibração de ácido gálico foi tomada como referência. As soluções de ácido gálico foram obtidas com base no peso molecular do ácido gálico, PM 170,12 g/mol. A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de 250, 200, 150, 100, 75 e 50 µM/mL, utilizando como solvente etanol 80°GL, sendo os resultados posteriormente convertidos de µM/mL para µg/g.

Em testes prévios sobre as mesmas condições, amostras foram analisadas em 5 concentrações cada, de 1000 µg, 500 µg, 100 µg, 50 µg, 10 µg/mL, utilizando como solvente etanol 80°GL. Após análises dos resultados obtidos, optou-se por utilizar as seguintes concentrações: extrato hidroetanólico bruto e fração hidroetanólica, 250 µg/mL, fração acetato de etila 1000 µg/mL e fração hexânica 500 µg/mL. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

50 µL da solução da amostra foram adicionados em cada poço da microplaca, e, em seguida 50 µL da solução de Folin, após os quais foram adicionados mais 100 µL da solução de carbonato de sódio 700 mM, a reação ficou por uma hora em total ausência de luz antes da leitura em espectrofotômetro em 760 nm. A solução de compensação foi obtida sob as mesmas condições, exceto pela adição de 50 µL de água no lugar da solução de Folin.

O branco foi obtido pela adição de 50 µL de água, e, em seguida 50 µL da solução de Folin, após os quais foram adicionados mais 100 µL da solução de carbonato de sódio 700 mM, após 1 hora a leitura espectrofotométrica foi efetuada em 760 nm.

5.10. Quantificação de derivados do ácido p-cumárico

Previamente, uma curva de calibração de ácido p-cumárico foi obtida nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µL/mL. Os resultados das áreas dos picos foram utilizados para a obtenção da curva de calibração.

Uma quantidade de 150 mg do extrato hidroetanólico bruto e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica foram solubilizadas em 5 mL de metanol; 2 mL destas amostras foram filtrados em filtro Millipore (0,45 µm) e armazenados em um “vial” para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se o cromatógrafo LaChrom, modelo D-7100 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemanha). Para determinar a composição química das amostras por CLAE, empregou-se uma coluna C-18 (Lichrochart Lichrospher 100 RP 18, 12,5 x 0,4 cm, diâmetro de partícula de 5µm. Merck, Darmstadt, Alemanha) e um gradiente linear (fluxo de 1 mL/min.) composto de metanol e água acidificada com 5% de ácido fórmico. O volume injetado foi de 20 µL. O tempo máximo de análise foi de 50 minutos e a detecção efetuada em comprimentos de onda de 280 e 340 nm. Para detecção dos picos foi utilizado um detector de rede de diodos. Para análise de dados foi utilizado o Merck-Hitachi modelo D-7100 (Chromatography Data Station - DAD Manager). Os picos analisados nos cromatogramas dos compostos foram identificados através de biblioteca de espectros de compostos isolados e identificados pela Dra. Maria Cristina Marcucci e com o auxílio de padrões comerciais. Foi empregado um *software* apropriado para interpretação dos resultados obtidos (TIP[®]). Foram quantificadas 3 moléculas, sendo o ácido p-cumárico (P-CUM), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA) e o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA).

5.11 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi medida no extrato e frações pela cinética de descoloração do DPPH• (radical 2,2'-difetil-1-picrilidrazila). O método se baseia na redução do DPPH, o qual apresenta um máximo de absorção em 517 nm. A partir do decaimento dos valores de absorbância, é possível avaliar a presença de compostos capazes de sequestrar o radical ou doar hidrogênios, e após o equilíbrio da reação ser atingido, é possível calcular a concentração de antioxidante necessária para reduzir 50% do DPPH• (CE50). O resultado deve ser expresso como atividade antioxidante capaz de reduzir 50% do DPPH• (CE50), devendo ser comparado a alguma substância com atividade antioxidante comprovada, no caso o Trolox®. O valor que designa a capacidade antioxidante é dado pela proporção entre as absorbâncias obtidas da amostra e do controle. Quanto maior o decaimento da absorbância, maior a atividade antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS et al, 1995).

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Microplate Synergy Biotec em microplacas com 96 poços (Fisher Scientific, Hanover Park, IL, 96 poços, 200 µL). Todas as leituras de absorbância foram realizadas em triplicata.

Previamente foi obtida uma solução de DPPH 100 µM e uma curva de calibração de Trolox® nas concentrações de 100 µmol/mL, 75 µmol/mL, 50 µmol/mL, 37,5 µmol/mL, 25 µmol/mL, 12,5 µmol/mL e 6,25 µmol/mL.

O extrato e as frações foram testados nas seguintes concentrações: extrato hidroetanólico bruto: 300, 200, 150, 100 e 75 µg/mL; fração hexânica: 700, 600, 500, 400 e 300 µg/mL; fração acetato de etila: 500, 400, 200, 150 e 100 µg/mL e fração aquosa 150, 125, 100, 75, e 50 µg/mL.

Foram adicionados em cada poço 50 µL do extrato hidroetanólico bruto e das frações, nas concentrações anteriormente citadas e 150 µL de solução metanólica de DPPH 100µM. O controle negativo foi feito com 200 µL de água e o positivo com uma curva de calibração de Trolox®. A leitura das absorbâncias (517 nm) foi efetuada após 2h, durante este tempo as placas foram mantidas em local com total ausência de luz (BROINIZI, 2007).

5.12. Atividade Antimicrobiana

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, FCF-USP. O extrato bruto hidroetanólico e as frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica foram testadas frente a uma bactéria Gram Positiva, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 25923), duas Gram Negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), e uma levedura, *Candida albicans* (ATCC 10231), pelo método de microdiluição (MORENO *et al.*, 2009; LIMA, M. *et al.*, 2006). Todos os testes foram realizados em caldo de soja Tryptose e os fungos em caldo de dextrose Sabouraud. O extrato bruto hidroetanólico e as frações foram diluídas em uma solução de metanol:dimetilsulfóxido 1:1 (v/v), obtendo-se as seguintes concentrações finais: 1000 µL/mL, 500 µL/mL, 250 µL/mL, 125 µL/mL, 50 µL/mL e 10 µL/mL. As soluções de antibióticos (1 mg/mL) de Cloranfenicol, Amicacina e Nistatina foram empregadas como controles positivos. O controle negativo foi feito com 10 µL metanol:dimetilsulfóxido 1:1. Em microplacas, o ensaio foi efetuado inoculando-se 10 µL das diluições das amostras ou controles em 190 µL de uma cultura em caldo com a concentração final de micro-organismos ajustada à 2×10^3 UFC/mL. As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 h para as bactérias e a 25°C por 48 h para os fungos. A inibição de crescimento foi determinada após a leitura da absorbância em 630 nm (SLT Spectra).

5.13. Nanocápsulas

Obtenção das nanocápsulas pelo método de precipitação de polímero pré-formado:

A fase aquosa e a fase orgânica foram preparadas separadamente:

Fase aquosa: em um béquer, foram transferidos 0,017 g de Polissorbato 80[®]. Adicionou-se 53 mL de água recém-purificada. Homogeneizou-se empregando barra magnética e agitador.

Fase orgânica: em um béquer, foram transferidos 0,1 g de Póli-ε-caprolactona, 0,077 g de monoestearato de sorbitan (span 60[®]), 0,3333 g de Myglyol[®] e o extrato hidroetanólico bruto. Adicionou-se 27 mL de acetona e submeteu-se à agitação em banho-maria por 30 minutos a 40 °C.

Formação das nanocápsulas

Após a completa solubilização das fases aquosa e orgânica, verteu-se a fase orgânica sobre a fase aquosa empregando-se um funil adequado. Agitou-se a suspensão obtida por 10 minutos. Após esse intervalo transferiu-se, cuidadosamente, a suspensão obtida para um balão de fundo redondo de 1 L e submeteu-se à evaporação rotativa a 37 °C, até volume final 10 mL.

As nanocápsulas foram obtidas com as concentrações 125, 250 e 500 mg/mL do extrato hidroetanólico bruto. Foi também obtida uma nanocápsula sem adição do extrato hidroetanólico bruto, denominada “branca”.

Para a quantificação de flavonóides, foi utilizada a mesma metodologia já descrita anteriormente, acrescentando-se que os flavonoides foram extraídos das nanocápsulas com etanol, após filtragem e retenção das nanocápsulas em filtro. O tamanho médio das nanocápsulas, a polidispersão e o potencial Zeta (Zetasizer Submicron Particle Size Analyzer) foram determinados.

5.14. Estudos *in vivo*

O projeto foi aprovado pela CEUA da UNICSUL – Universidade Cruzeiro do Sul, com ciência da CEUA da FCF-USP.

5.14.1. Ensaios de cicatrização em ferida no dorso de animais

O projeto foi submetido à CEUA (Comissão de Ética em Uso de Animais), na instituição onde os experimentos foram realizados (Universidade Cruzeiro do Sul-Campus Liberdade), e a autorização (Anexo 1) foi apresentada a CEUA (Comissão de Ética em Uso de Animais) da FCF-USP.

Os ensaios foram realizados no Instituto de Ciências da Atividade Física e Esporte da Universidade Cruzeiro do Sul (ICAFE – UNICSUL).

Os animais foram acondicionados em caixas de polietileno em condições de umidade e temperatura controlados (46-50 % e 22 °C respectivamente), com ciclos claro/escuro de 12 horas invertido. O período de adaptação às condições ambientais foi de 7 dias. Todos receberam água e ração *ad libitum*.

O ensaio de cicatrização foi feito com 42 ratos Wistar do sexo masculino (peso aproximado de 150 a 180g), oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram separados aleatoriamente em 6 grupos de 6 animais sendo, controle negativo (solução fisiológica), (MAGALHÃES, 2007) e tratados: extrato bruto hidroetanólico, fração hexânica, fração acetato de etila, fração hidroetanólica e branco (foi feito um creme de Hostacerim® SAF a 3% com incorporação do extrato hidroetanólico bruto e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica a 1%). A quantidade aplicada foi a mínima suficiente para cobrir totalmente a ferida. (GARROS, 2006).

Os animais foram anestesiados por xilazina (20 mg.mL⁻¹) e ketamina (50 mg.mL⁻¹), posicionados em decúbito ventral, e tiveram o dorso depilado por tricotomia (LIMA, 2006), seguido de limpeza com etanol 70 %. Uma ferida foi aberta (FIGURA 3), até a fascia muscular, com um *punch* metálico, de 1 cm² de área. A hemostasia, quando necessária, foi feita por compressão digital com gaze estéril (GARROS, 2006; LIMA, 2006).

Figura 3 – Local da incisão da lesão no dorso do rato.

A aplicação do creme foi realizada topicamente 1 vez ao dia até o final do processo cicatricial (GARROS, 2006).

Foram anotadas quaisquer perturbações comportamentais presentes como, tremor, piloereção e diminuição de movimentação. O tamanho dos ferimentos foi medido diariamente por meio de fotografia digital e análise digital da área foi feita.

Após os experimentos os animais foram mortos em câmara de CO₂.

5.14.2. Ensaios de bolsa de ar *in-vivo* - Quantificação de citocinas (TNF, L-selectina, VEGF e CINC) e contagem de neutrófilos

Previamente uma solução tampão de PBS (tampão fosfato salino) foi obtida pela dissolução de 8g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,2 g de Na₂HPO₄ e 1,5 g de KH₂PO₄ em 1 L de água destilada. O pH foi ajustado para 7,4, em uma solução de LPS (Lipopolissacarídeo de *E.Coli* 026-B6, Sigma®), 0,3% em PBS.

O ensaio de contagem de neutrófilos e quantificação de citocinas foi feito com ratos Wistar machos (150 a 180g), oriundos do biotério da UNICSUL – Universidade Cruzeiro do Sul, separados aleatoriamente em 10 grupos de 9 animais sendo, controle negativo (PBS), controle positivo (PBS+LPS), tratados: extrato bruto hidroetanólico, fração hexânica, fração acetato de etila e fração hidroetanólica e tratados com LPS: extrato bruto hidroetanólico+LPS, fração hexânica+LPS, fração acetato de etila+LPS e fração hidroetanólica+LPS.

Os animais foram anestesiados por xilazina (20 mg.mL^{-1}) e ketamina (50 mg.mL^{-1}), posicionados em decúbito ventral, e tiveram o dorso depilado por tricotomia (LIMA, 2006), seguido de limpeza com etanol 70%. Uma bolsa de ar estéril foi inflada no dorso dos animais com o auxílio de uma seringa, sendo o volume total de ar injetado de 10 mL, um molde foi utilizado para delinear e conter a bolsa de ar no formato e área desejados.

Após 7 dias os animais foram anestesiados por xilazina (20 mg/mL^{-1}) e ketamina (50 mg/mL^{-1}) e as bolsas de ar foram novamente infladas. Em seguida, foi introduzido no interior da bolsa de ar 1 mL de cada tratamento na concentração de 1 mg/mL em PBS. Decorridas 4 horas, os animais foram novamente anestesiados, uma incisão foi feita sobre a bolsa de ar e seu interior foi lavado com 2mL de solução de PBS. O material foi recolhido e as amostras foram centrifugadas (2500 RPM, 10 min 25°C), o sobrenadante foi utilizado para quantificação de citocinas e o *pellet* (resíduo), após ressuspensão em PBS (1 mL) foi utilizado para contagem de neutrófilos.

A contagem de neutrófilos foi feita em equipamento BD-Accuri[®] C6 FLOW CYTOMETER.

A quantificação de citocinas foi efetuada após a obtenção de curvas de calibração em concentrações conhecidas (CINC: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 pg/mL; L-selectina: 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 pg/mL; TNF 500, 250, 125 e 62,5 pg/mL e VEGF: 250, 125, 62,5, 31,25 15,6125 e 7,562 pg/mL (Todas as citocinas: Kits R&D Systems, Minneapolis – USA).

O princípio básico do teste é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do antígeno. Neste caso, a fase sólida, ou seja, o anticorpo de captura é formado por anti-TNF- α , IL-6, IL-1beta, (dependente do ensaio), diluído em PBS e o anticorpo de detecção utilizado foi específico (dependente do ensaio). Na revelação da reação utilizou-se estreptavidina conjugada com peroxidase de raiz forte (HRP) (diluuição 1:200 com o reagente diluente). O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de H_2O_2

e tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi terminada pela adição de H_2SO_4 . A leitura foi realizada em 450 nm e uma leitura de correção em 540 nm. A leitura de correção foi importante para eliminar qualquer interferente presente na placa. O procedimento de dosagem é igual para a dosagem de todas as citocinas mudando apenas as concentrações finais dos anticorpos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems).

5.15. Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. O teste ANOVA foi executado com o *software* estatístico R Project 3.0.1. Resultados foram considerados significativos quando valor de $p \leq 0,05$.

6. Resultados

6.1. Determinação do teor de cinzas

A amostra apresentou teor de cinzas igual a 2 %, estando dentro das especificações do Ministério da Agricultura, sendo o máximo de 5 % (m/m); (BRASIL, 2001).

6.2. Perda por dessecação a 105°C

A amostra apresentou 5 % de perda por dessecação a 105 °C, estando dentro das especificações do Ministério da Agricultura, sendo o máximo de 8 % (m/m) (BRASIL, 2001).

6.3. Análise microscópica

A análise microscópica evidenciou a presença de estruturas vegetais características de *Baccharis dracunculifolia* (FIGURA 4), tais como tricomas

glandulares pluricelulares, tricomas tectores em forma de T, estômatos anomocíticos e células com contorno poligonal.

FIGURA 4: Análise microscópica da amostra de própolis verde. A e B: fragmentos foliares, estômatos anomocíticos e células com paredes poligonais; C: tricoma tector pluricelular em forma de T; A e D: tricomas glandulares pluricelulares. (Foto: Harry Léo Wysocki Júnior, 40X).

6.4. Fracionamento químico

Do extrato bruto hidroetanólico, após liofilização, obteve-se 82,50 g de extrato liofilizado, correspondendo a 27,5 % da amostra inicial de própolis. Após o

fracionamento químico e concentração das frações obteve-se os seguintes valores (Tabela 1):

Tabela 1 – Rendimento obtido do extrato bruto hidroetanólico e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica obtidas do extrato bruto de própolis verde

Amostra	Rendimento (g)	Rendimento (%)
Extrato bruto hidroetanólico	82,50	27,50
Fração hexânica	0,78	1,55
Fração acetato de etila	33,28	66,56
Fração hidroetanólica	14,00	28,00

6.5. Triagem química

O extrato hidroetanólico bruto apresentou o seguinte resultado na triagem química (Tabela 2):

Tabela 2 – Triagem química de extrato bruto hidroetanólico de própolis verde.
 (-)= resultado negativo (+)=resultado fracamente positivo (++)= resultado positivo (+++)=resultado fortemente positivo.

Reação	Resultado
Grupo fitoquímico: Antraquinonas	
Bornträger	-
Grupo fitoquímico: Cumarinas	
Soluções alcalinas	-
Grupo fitoquímico: Alcalóides	
Bertrand	+
Bouchardat	+
Dragendorff	+
Mayer	+
Grupo fitoquímico: Flavonóides	
Shinoda	+++
Cloreto de alumínio	+++
Hidróxidos alcalinos	+++
Grupo fitoquímico: Taninos	
Sais de ferro	+++
Acetato de chumbo	+++
Acetato de cobre	+++
Precipitação de alcalóides	+++
Grupo fitoquímico: Terpenos e esteróis:	
Liebermann-Burchard	++
Grupo fitoquímico: Saponinas	
Persistência de espuma	+

6.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As Figuras 5 e 6 mostram as análises por CCD de amostras de própolis verde obtidas conforme as condições experimentais descritas anteriormente (item 5.7, materiais e métodos).

A – CCD1

B – CCD2

Figura 5 – CCD de amostras de própolis verde. A: CCD 1 e B :CCD 2: Fase móvel clorofórmio/metanol 9:1 e fase estacionária Sílica gel GF₂₅₄ Merck art. 7731. Revelador: CCD 1 = visível, CCD 2 NP-PEG UV 366nm. (Foto: Harry Léo Wysocki).

Figura 6 - CCD3

Figura 6 - CCD3 - Cromatograma do extrato hidroetanólico bruto (1) e frações hexânica (2), acetato de etila (3) e hidroetanólica (4) de própolis verde. CCD 3: Fase móvel clorofórmio/metanol 9:1 e fase estacionária Sílica gel Merck art. 7731. Revelador: Anisalaldeído sulfúrico.(Foto: Harry Léo Wysocki Júnior).

6.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A seguir são apresentados os cromatogramas do extrato bruto hidroetanólico, e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica (Figura 7):

Figura 7A - Cromatograma do extrato hidroetanólico bruto de própolis verde

Figura 7B - Cromatograma da fração hexânica de própolis verde

Figura 7C - Cromatograma da fração acetato de etila de própolis verde

Figura 7D - Cromatograma da fração hidroetanólica de própolis verde

Figura 7 - Cromatogramas obtidos a partir do extrato hidroetanólico bruto (Figura 7A) e frações hexânica (Figura 7B), acetato de etila (Figura 7C) e hidroetanólica (Figura 7D) de própolis verde

Fase estacionária: coluna Shimadzu® C-18 CLC-ODS (M), 250 x 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm. Fase móvel: água Mili-Q® e ácido acético (19:1) (A)/Metanol (B), iniciando com 70% A e 30% B; 60% A e 40% B em 15 min; 50% A e 50% B em 30 min; 40% A e 60% B em 45 min; 25% A e 75% B em 65 min; 25% A e 75% B em 85 min; 10% A e 90% B em 95 min; 70% A e 30% B em

105 min; 70% A e 30% B em 115 min; sob fluxo de 1 mL/min volume de injeção de 20 µL.

6.7. Quantificação de flavonóides totais

Após leitura das absorbâncias das soluções padrão, obteve-se a curva de calibração abaixo (Gráfico 1):

Gráfico 1- Curva de calibração da quercetina

Os valores obtidos para a quantificação de flavonóides totais, em equivalentes quercetina, do extrato bruto hidroetanólico e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica são apresentados a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantificação de flavonóides totais (mg/g) no extrato bruto hidroetanólico e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.

Amostra	Flavonóides totais (mg/g)	Rendimento (%)
Extrato bruto hidroetanólico	20,6	2,06
Fração Hexânica	3,5	0,35
Fração Acetato de Etila	22,8	2,28
Fração Hidroetanólica	19,7	1,97

6.8. Quantificação de fenólicos totais

Após a coleta dos dados e cálculo das médias das leituras de absorbância, obteve-se a seguinte curva de calibração (Gráfico 2), em $\mu\text{Mol/mL}$ de ácido gálico:

Gráfico 2 – Curva de calibração de fenóis. Absorbância *versus* concentração do ácido gálico ($\mu\text{Mol/mL}$)

Os valores obtidos após a quantificação de fenólicos totais, em equivalentes de ácido gálico (mg/g), do extrato etanólico bruto e das frações são apresentados a seguir (Tabela 4).

Tabela 4 – Quantificação de fenólicos totais, expressos em equivalentes de ácido gálico (mg/g) e rendimento em % do extrato bruto hidroetanólico e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica de própolis verde

Amostra	Fenólicos totais (mg/g)	Rendimento (%)
Extrato Bruto Hidroetanólico	91,85	9,0
Fração Hexânica	51,36	5,1
Fração Acetato de Etila	87,19	8,7
Fração Hidroetanólica	172,08	17,2

6.9. Quantificação de derivados do ácido p-cumárico

Após a coleta dos dados e cálculo das médias de absorvância, obteve-se a seguinte curva de calibração, em µg/mL de ácido p-cumárico (Gráfico 3):

Gráfico 3 – Curva de calibração de para a quantificação de ácidos cumáricos. Absorvância *versus* a concentração do ácido p-cumárico (µg/mL)

A seguir (Figura 8) são apresentados os cromatogramas obtidos para a quantificação de derivados do ácido p-cumárico.

Figura 8A – Cromatograma do extrato hidroetanólico bruto. Setas indicam picos quantificados. Rt (min): pico1=5,08; pico 2=20,44 e pico 3=27,33min. Pico 1= ácido p-cumárico, Pico 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, Pico 3= ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico. Gradiente linear (1 mL/min.) metanol e água acidificada com 5% de ácido fórmico. Volume injetado= 20 µL.

Figura 8B – Cromatograma da fração hexânica de extrato de própolis verde. Setas indicam picos quantificados. Rt (min): pico1=5,08; pico 2=20,44 e pico 3=27,33min. Pico 1= ácido p-cumárico, Pico 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, Pico 3= ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico. Gradiente linear (1 mL/min.) metanol e água acidificada com 5% de ácido fórmico. Volume injetado= 20 µL.

Figura 8C – Cromatograma do fração acetato de etila de extrato de própolis verde. Setas indicam picos quantificados. Rt (min): pico1=5,08; pico 2=20,44 e pico 3=27,33min Pico 1= ácido p-cumárico, Pico 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, Pico 3= ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico. Gradiente linear (1 mL/min.) metanol e água acidificada com 5% de ácido fórmico. Volume injetado= 20 μ L).

Figura 8D – Cromatograma da fração hidroetanólica. Setas indicam picos quantificados. Rt (min): pico1=5,08; pico 2=20,44 e pico 3=27,33min Pico 1= ácido p-cumárico, Pico 2= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, Pico 3= ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico. Gradiente linear (1 mL/min.) metanol e água acidificada com 5% de ácido fórmico. Volume injetado= 20 μ L

A seguir, a Tabela 5 apresenta os valores obtidos para a quantificação de derivados do ácido p-cumárico para o extrato etanólico bruto e frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.

Tabela 5 - Valores obtidos a partir da quantificação de derivados do ácido p-cumárico para o extrato etanólico bruto e frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica de própolis verde. P-CUM=ácido p-cumárico, PHCA=ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e DHCA= ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico ($\mu\text{g/mL}$).

Amostra								
	Bruto		Hexânica		Acetato		Hidroetanólica	
Molécula	($\mu\text{g/mL}$)	Rt (min)	($\mu\text{g/mL}$)	Rt (min)	($\mu\text{g/mL}$)	Rt (min)	($\mu\text{g/mL}$)	Rt (min)
P-CUM	31,96	5,08	26,37	5,04	26,97	5,07	40,44	5,98
PHCA	32,50	20,44	121,14	20,72	84,98	20,90	25,53	20,90
DHCA	72,54	27,33	54,94	27,08	64,83	27,13	12,82	27,05

A Tabela 6 apresenta os valores em porcentagem (%) dos derivados do ácido p-cumárico para o extrato etanólico bruto e frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica.

Tabela 6 – Quantificação de derivados do ácido cinâmico para o extrato bruto hidroetanólico e frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica (%). PHCA= ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico DHCA= ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico.

	Extrato hidroetanólico bruto (%)	Fração hexânica (%)	Fração acetato de etila (%)	Fração hidroetanólica (%)
p-cumárico	0,107	0,088	0,090	0,135
PHCA	0,108	0,404	0,283	0,085
DHCA	0,242	0,183	0,216	0,043

6.10. Atividade antioxidante

A seguir é apresentada a curva de calibração (Gráfico 4), em $\mu\text{Mol/mL}$ de Trolox

Gráfico 4 - Curva de calibração utilizada no cálculo da atividade antioxidante. Absorbância *versus* a concentração do Trolox® (µM/mL).

A capacidade antioxidante do extrato hidroetanólico bruto e das frações foi calculada através da proporção entre os valores da leitura das absorbâncias, e o Trolox®.

$$\% \text{redução DPPH} = [(Abs_{\text{controle}} - Abs_{\text{amostra}}) / Abs_{\text{controle}}] \times 100$$

onde Abs_{controle} é a absorbância do controle e Abs_{amostra} a absorbância da amostra.

O valor indicado na tabela 7 reflete a concentração em µg/mL capaz de reduzir em 50% o DPPH· (CE₅₀).

Tabela 7 – Concentração (CE₅₀) do extrato bruto hidroetanólico e das frações hexânica, acetato de etila e hidroetanólica de própolis verde, quando comparado ao Trolox®

Amostra	(CE₅₀) - (µg/mL)
Extrato Bruto Hidroetanólico	150
Fração Hexânica	700
Fração Acetato de Etila	250
Fração Hidroetanólica	50

6.11. Atividade antimicrobiana

Até uma concentração de 1 mg/mL do extrato bruto hidroetanólico e das frações, não houve atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados.

6.12. Nanocápsulas

A seguir (Tabela 8) são apresentados os tamanhos médios das nanocápsulas, dados de polidispersão, potencial Zeta e concentração de flavonoides em função da concentração do extrato hidroetanólico bruto de própolis verde.

Tabela 8- Parâmetros das nanocápsulas em função da concentração de extrato hidroetanólico bruto incorporado em 3 concentrações: 125, 250 e 500 µg/mL, além da branca. Diâmetro médio (nm), polidispersão, quantificação de flavonóides e potencial Z.

Concentração (µg/mL)	Diâmetro médio (nm)	Índice de Polidispersão	Quantificação de flavonoides (% m/m)	Potencial Zeta (mV)
0	220,25	0,140	-	-21.8
125	239,55	0,198	4,63	-31.0
250	233,53	0,195	9,25	-35.4
500	229,65	0,195	18.5	-26.2

6.13. Ensaios de cicatrização

O Gráfico 5 demonstra a evolução do processo cicatricial do extrato hidroetanólico bruto e das frações hexânica, acetato de etila e hidroalcoólica de própolis verde, assim como do controle negativo - solução fisiológica e branco.

Gráfico 5- Áreas das feridas em função do tempo entre os grupos analisados: extrato hidroetanólico bruto (bruto) e das frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroetanólica de própolis verde, assim como do controle negativo - solução fisiológica (soro) e branco (branco).

A Tabela 9 apresenta as áreas das feridas após 24 horas do tratamento.

Tabela 9 – Áreas das feridas (mm²): extrato hidroetanólico bruto (bruto) e frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, assim como do controle negativo (solução fisiológica) e branco (branco). 24 horas.

Amostra	Sol. Fisiológica	Bruto	Hexânica	Acetato	Aquosa	Branco
Média	113,46	117,46	102,29	105,38	99,50	104,33
Desvio padrão	11,98	11,22	15,51	9,40	10,32	7,43

p-valor: 0,007

O Gráfico 6 apresenta as áreas das feridas após 24 horas do tratamento.

Gráfico 6 – Áreas (mm²) das feridas dos tratamentos: Extrato hidroetanólico bruto (bruto) e das frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, assim como do controle negativo - solução fisiológica (soro) e branco (branco) - 24 horas

A Tabela 10 apresenta as áreas das feridas após 72 horas do tratamento.

TABELA 10 –Áreas das feridas (mm²) - 72 horas Extrato hidroetanólico bruto (bruto) e frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, assim como do controle negativo (solução fisiológica) e branco (branco).

Amostra	Sol. Fisiológica	Área das feridas (mm ²)				
		Bruto	Hexânica	Acetato	Aquosa	Branco
Média	80,21	84,21	79,75	84,67	87,13	75,42
Desvio padrão	8,21	42,18	42,70	15,02	11,79	38,73
p-valor: 0,098						

O Gráfico 7 apresenta as áreas das feridas após 72 horas do tratamento.

Gráfico 7 – Áreas (mm²) das feridas dos tratamentos Extrato hidroetanólico bruto (bruto) e das frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, assim como do controle negativo - solução fisiológica (soro) e branco (branco) - 72 horas

A Tabela 11 apresenta as áreas das feridas após 6 dias do tratamento.

Tabela 11 – Áreas das feridas (mm²) – 6 dias Extrato hidroetanólico bruto (bruto) e frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, controle negativo – solução fisiológica e branco (branco).

	áreas das feridas (mm ²)					
Amostra	Sol. Fisiológica	Bruto	Hexânica	Acetato	Aquosa	Branco
Média	26,08	42,21	40,96	28,83	39,21	45,21
Desvio padrão	5,27	7,78	16,48	18,69	10,25	17,47
p-valor: 0,011						

O Gráfico 8 apresenta as áreas das feridas após 6 dias do tratamento.

Gráfico 8 – Áreas (mm²) das feridas dos tratamentos – 6 dias Extrato hidroetanólico bruto (bruto) e frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, assim como controle negativo – solução fisiológica (soro) e branco (branco)

A Tabela 12 apresenta a medida das áreas das feridas após 10 dias do tratamento.

Tabela 12 –Medida das áreas das feridas (mm²) – 10 dias Extrato hidroetanólico bruto (bruto) e frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, controle negativo – solução fisiológica e branco (branco).

Amostra	áreas das feridas (mm ²)					
	Solução fisiológica	Bruto	Hexânica	Acetato	Aquosa	Branco
Média	3,77	4	5,62	5,62	4,04	6,33
Desvio padrão	5,55	4,34	6,80	7,71	2,70	4,26

p-valor: 0,94

O Gráfico 9 apresenta as áreas das feridas após 10 dias do tratamento.

Gráfico 9 –Áreas (mm²) das feridas dos tratamentos - 10 dias Extrato hidroetanólico bruto (bruto) e frações hexânica (hexânica), acetato de etila (acetato) e hidroalcoólica (aquosa) de própolis verde, controle negativo – solução fisiológica (soro) e branco (branco)

6.13.2 Quantificação de neutrófilos

Os resultados obtidos para a quantificação de neutrófilos são apresentados na Tabela 13:

Tabela 13 –Migração de neutrófilos (neutrófilos/μL) para os tratamentos: negativo (PBS), extrato hidroetanólico bruto e frações hexânica, acetato de etila e

hidroetanólica, e tratamentos positivos: (LPS+PBS), extrato hidroetanólico bruto+LPS e frações hexânica+LPS, acetato de etila+LPS e hidroetanólica+LPS de própolis verde

	neutrófi los		/ μL		
Amostra	PBS	Bruto	Hexânica	Acetato	Hidroetanólica
Média	36,75	5,22	21,56	9,67	20,33
Desvio Padrão	52,61	8,23	20,46	10,05	25,68
Amostra	PBS +LPS	Bruto +LPS	Hexânica +LPS	Acetato +LPS	Hidroetanólica +LPS
Média	436,89	1598,67	240,44	168,33	695,00
Desvio Padrão	480,33	1988,20	309,72	214,76	1231,83

A Figura 9 representa a média da contagem de neutrófilos para os tratamentos: negativo (PBS) (A), extrato hidroetanólico bruto de própolis (B) e frações hexânica (C), acetato de etila (D) e hidroetanólica (E).

Figura 9A- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) no controle negativo (PBS). NO=29

Figura 9B- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) no extrato hidroetanólico bruto. NO=3

Figura 9C- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) na fração hexânica. NO=25

Figura 9D- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) na fração acetato de etila. NO=17

Figura 9E- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) na fração hidroetanólica. NO=17

Figura 9- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (neutrófilos/ μ L), para o grupo negativo (9A), extrato bruto hidroetanólico (9B) e para as frações hexânica (9C), acetato de etila(9D) e hidroetanólica (9E). NO/ μ L

A Figura 10 representa a média da contagem de neutrófilos para os tratamentos: positivo (LPS+PBS) (A), extrato hidroetanólico bruto+LPS (B) e frações hexânica+LPS (C), acetato de etila+LPS (D) e hidroetanólica+LPS (E) de extrato de própolis.

Figura 10A- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) no controle positivo (LPS+PBS). NO=246

Figura 10B- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) no extrato bruto hidroetanólico (LPS+PBS). NO=2232

Figura 10C- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) na fração hexânica+LPS. NO=141

Figura 10D- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) na fração acetato de etila+LPS. NO=166

Figura 10E- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO) na fração hidroetanólica+LPS. NO=459

Figura 10- *Blotspot* representativo da média da quantificação de neutrófilos (NO/ μ L), para o grupo negativo (10A), extrato bruto hidroetanólico (10B) e para as frações hexânica (10C), acetato de etila(10D) e hidroetanólica (10E). NO/ μ L

Gráfico 10: contagem de neutrófilos (NO/ μ L) do grupo controle negativo (PBS).

Gráfico 10- Quantificação de neutrófilos (NO). Extrato hidroetanólico bruto (bruto) de própolis, fração hexânica (hexânica), fração acetato de etila (acetato) e fração hidroalcoólica (aquosa), assim como do controle negativo (PBS).

O gráfico 11 apresenta a contagem de neutrófilos (NO/ μ L) do grupo controle positivo.

GRAFICO 11- Quantificação de neutrófilos (NO). Extrato hidroetanólico bruto (bruto), fração hexânica (hexânica), fração acetato de etila (acetato) e fração hidroalcoólica (aquosa), assim como do controle positivo (PBS+LPS).

A Tabela 14 apresenta a comparação da contagem de neutrófilos entre o grupo controle (PBS) e o grupo positivo (PBS+LPS).

Tabela 14 – Comparação entre a contagem de neutrófilos entre o grupo controle negativo (PBS) e o grupo controle positivo (PBS+PLS).

Grupo	PBS	PBS+LPS
Média	18,70556	627,8667
Desvio padrão	12,24618	579,8058

O gráfico 12 apresenta a comparação entre o grupo tratamento negativo (PBS) e o grupo tratamento positivo (LPS) para a contagem de neutrófilos.

Gráfico 12 – Comparação entre a contagem de neutrófilos entre o grupo controle negativo (PBS) e o grupo controle positivo (PBS+PLS)

p-valor: 0,046

Rejeita-se a igualdade entre as médias

6.13.3 Quantificação de citocinas (CINC, L-Selectina, TNF e VEGF)

O resultado obtido a partir da curva de calibração da citocina CINC é apresentado no Gráfico 13

Gráfico 13- Curva de calibração da citocina CINC.

No gráfico 14 são apresentados os valores da citocina CINC (pg/mL) para os tratamentos controles negativos: extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq).

Gráfico 14 – Valores obtidos para a quantificação da citocina CINC (pg/mL) para os tratamentos extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq).

p-valor: 0,399

Não se pode rejeitar a igualdade entre as médias

No gráfico 15 são apresentados os valores obtidos para a quantificação da citocina L-selectina (pg/mL) para os tratamentos extrato hidroetanólico bruto+LPS

(Bruto+LPS), fração hexânica+LPS (Hex+LPS), fração acetato de etila+LPS (Aco+LPS) e fração hidroetanólica+LPS (Aq+LPS).

Gráfico 15 – Valores obtidos para a quantificação da citocina CINC (pg/mL) para os tratamentos extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq).

p-valor: 0,001

Pode-se rejeitar a igualdade entre as médias

O resultado obtido a partir da curva de calibração da citocina L-selectina é apresentado.

Gráfico 16 - Curva de calibração - citocina L-Selectina.

No Gráfico 17 são apresentados os valores obtidos para a quantificação da citocina L-selectina (pg/mL) para os tratamentos PBS, extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq).

Gráfico 17 –Quantificação da citocina L-selectina (pg/mL) para os tratamentos extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq).

p-valor: 0,0027

Pode-se rejeitar a igualdade entre as médias

O gráfico 18 mostra os valores obtidos para a quantificação da citocina L-selectina (pg/mL) para os tratamentos a seguir: PBS+LPS, extrato hidroetanólico bruto+LPS (Bruto+LPS), fração hexânica+LPS (Hex+LPS), fração acetato de etila+LPS (Aco+LPS) e fração hidroetanólica+LPS (Aq+LPS).

Gráfico 18 –Quantificação da citocina L-selectina (pg/mL) para os tratamentos extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq) de própolis verde.

p-valor: 0,72

O resultado obtido a partir da curva de calibração da citocina TNF é apresentado Gráfico 19

Gráfico 19 - Curva de calibração - citocina TNF.

No gráfico 20 estão representados os valores obtidos para a quantificação da citocina VGEF (pg/mL) para os tratamentos extrato hidroetanólico bruto+LPS, fração hexânica+LPS, fração acetato de etila+LPS e fração hidroetanólica+LPS.

Gráfico 20 –Quantificação da citocina TNF (pg/mL) para os tratamentos extrato hidroetanólico bruto+LPS (BRUTO+LPS), fração hexânica+LPS (HEX+LPS), fração acetato de etila+LPS (Aco+LPS) e fração hidroetanólica+LPS (Aq+LPS). P=0,33

Não pode-se rejeitar a igualdade entre as médias

O resultado obtido a partir da curva de calibração da citocina VGEF é apresentado abaixo (Gráfico 21):

Gráfico 21- Curva de calibração - citocina VGEF.

O Gráfico 22 apresenta os valores obtidos para a quantificação da citocina VGEF (pg/mL) para os tratamentos PBS, extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq) de própolis verde.

Gráfico 22 – Quantificação da citocina VGEF (pg/mL) para os tratamentos PBS, extrato hidroetanólico bruto (Bruto), fração hexânica (Hex), fração acetato de etila (Aco) e fração hidroetanólica (Aq) de própolis verde.
 $P=0,011$

Rejeita-se a igualdade entre as médias

No gráfico 23 são apresentados os valores obtidos para a quantificação da citocina VGEF (pg/mL) para os tratamentos PBS+LPS, extrato hidroetanólico bruto+LPS (Bruto+LPS), fração hexânica+LPS (Hex+LPS), fração acetato de etila+LPS (Aco+LPS) e fração hidroetanólica +LPS (Aq+LPS).

Gráfico 23 – Valores obtidos para a quantificação da citocina VGEF (pg/mL) para os tratamentos PBS+LPS, extrato hidroetanólico bruto+LPS (Bruto+LPS), fração hexânica+LPS (Hex+LPS), fração acetato de etila+LPS (Aco+LPS) e fração hidroetanólica+LPS (Aq+LPS). $P=0,004$

Rejeita-se a igualdade entre as médias.

7. Discussão

Todas as amostras obtidas apresentaram coloração verde, características macroscópicas e organolépticas parecidas entre si, principalmente o odor característico deste tipo de própolis, muito similar ao da planta (*B. dracunculifolia* CD) utilizada pelas abelhas para a confecção da própolis verde. Mesmo pertencendo a diferentes fornecedores, as amostras se mostraram muito semelhantes. Todas as amostras foram fornecidas com a classificação de “própolis verde”. Embora denominadas de própolis verde, o extrato obtido de todas as amostras mostrou coloração marrom esverdeada.

Os ensaios físico-químicos demonstraram que a amostra está de acordo com as especificações do Ministério da Agricultura-Brasil, entretanto devido às características variadas dos diversos tipos de própolis, outros valores podem ser encontrados, devido a diferenças em suas origens botânicas.

A análise microscópica da amostra de própolis apresentou fragmentos estruturais com características compatíveis com aquelas apresentados por *B. dracunculifolia*: tricomas tectores em forma de T, com pedúnculo pluricelular e uma célula apical periclinalmente alongada, com paredes espessadas, complexos estomáticos do tipo anomocítico e tricomas pluricelulares glandulares reunidos pela base em tufo, sendo estas estruturas comumente encontradas em amostras de própolis verde provenientes de *B. dracunculifolia* (PEGORIN *et al.* 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2005; BUTEL *et al.*, 2004).

Uma comparação inicial por CCD de diversas amostras comerciais denominadas “própolis verde” mostrou um perfil cromatográfico semelhante, apenas ressaltando que as diversas fases móveis descritas na literatura não se adequaram a este tipo de amostra, não apresentando uma resolução satisfatória, fato possivelmente associado à variação da origem botânica do material, já que os artigos que sugeriam outras fases móveis analisavam amostras provenientes de diferentes localidades e com outras denominações que não “própolis verde”. O perfil cromatográfico obtido por CCD apresentou uma grande quantidade de manchas e em diversas colorações, indicando a presença de vários grupos de moléculas.

O perfil cromatográfico (CCD) do primeiro fracionamento químico efetuado com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol da amostra fornecida pelo Depto. de Alimentos da FCF USP, evidenciou que as frações diclorometano e acetato de etila apresentaram um perfil cromatográfico muito semelhante, o que levou a outra tentativa de fracionamento, desta vez com hexano, acetato de etila e etanol/H₂O 50% (fração hidroetanólica). A avaliação por CCD destas frações apresentou um perfil cromatográfico indicando uma boa separação dos

compostos, com a vantagem da não necessidade do uso de solventes clorados, geralmente de alta toxicidade ambiental.

O cromatograma obtido por CLAE confirma os dados obtidos por CCD, evidenciando que houve boa separação dos constituintes químicos. A fração hexânica contém os compostos mais apolares com valores de R_t (retention time) acima de 50 min, na fração acetato de etila houve a extração de uma grande variedade de compostos que se distribuíram por todo o cromatograma, tendo um perfil muito parecido com o extrato hidroetanólico bruto, enquanto na fração hidroetanólica os compostos se concentram no início do cromatograma (R_t abaixo dos 30 min.), tratando-se principalmente de compostos mais polares. Ainda que alguns compostos apareçam em mais de uma fração, sempre houve uma das frações com um percentual majoritário dos mesmos. Não foi feita a identificação de moléculas por espectroscopia de massas (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), visto este tipo de amostra já apresentar um perfil químico conhecido, com a identificação da grande maioria de seus compostos, além disso, dentro do âmbito do objetivo do trabalho, o isolamento de moléculas apenas seria realizado caso o ensaio de cicatrização apresentasse resultados expressivos que justificassem a necessidade de isolamento e de identificação química e estrutural das substâncias/moléculas.

A quantificação dos flavonóides expressos em quercetina apresentou um teor de 2,06% no extrato bruto hidroetanólico, 0,35% na fração hexânica, 2,28% na fração acetato de etila e 1,97% na fração hidroalcoólica. Já era esperada uma maior quantidade de flavonóides na fração acetato de etila, visto que um grande número de flavonóides apresenta polaridade mediana, sendo extraídos com este solvente, embora também se observou uma quantidade significativa dos mesmos na fração hidroalcoólica, sendo que nesta fração é esperada uma maior quantidade de compostos fenólicos mais polares. Amostras de própolis geralmente não apresentam flavonoides glicosilados, condição esta favorecida no caso de própolis verde, pela característica da planta utilizada como fonte de resina também não apresentar grande quantidade destes flavonoides. Os valores encontrados coincidem com as especificações do Ministério da Agricultura

(apenas para a própolis bruta) e estão de acordo com outros dados obtidos na literatura para este tipo de amostra de própolis (FURNARI e FERRO 2006; CHANG *et al*, 2002; BATISTA DE ALMEIDA *et al*, 1997).

A quantificação dos fenólicos totais expressos em ácido gálico demonstrou maior concentração na fração hidroalcoólica (17,2%), seguida do extrato bruto hidroalcoólico (9,02%), da fração acetato de etila (8,71%) e da fração hexânica (5,13%), coincidindo com o esperado, levando-se em consideração a polaridade desta classe de compostos.

Derivados do ácido p-cumárico estão presentes em todas as frações. O ácido p-cumárico encontra-se em maior concentração na fração hidroetanólica (0,135%), no extrato hidroetanólico bruto (0,107%). O ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico apresentou maior concentração na fração hexânica (0,404%), seguida da fração acetato de etila (0,283%), do extrato hidroetanólico bruto (0,108%) e a fração hidroetanólica apresentou o valor mais baixo (0,085%). Já o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico apresentou uma concentração mais alta no extrato hidroetanólico bruto (0,242%), seguida pela fração acetato de etila (0,216%), a fração hexânica (0,183%) e a fração hidroetanólica (0,043%).

As diferenças estruturais entre os fenilpropanóides podem ser as responsáveis pela distribuição destes em todas as frações obtidas; a diferença estrutural entre as três moléculas quantificadas é referente ao número de substituintes no anel aromático, sendo que o ácido p-cumárico apresenta-se como um fenilpropanóide simples, sem substituintes. Já o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, tendo sua estrutura derivada do ácido p-cumárico, tem um substituinte prenila no carbono 3, enquanto o 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico apresenta dois substituintes prenila, no anel aromático, nas posições 3 e 5, respectivamente. Não se deve considerar apenas a polaridade como fator determinante em um fracionamento químico por solventes; se assim fosse, esperar-se-ia que o composto 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico apresentasse maior concentração na fração hexânica, fato que não ocorreu. Possíveis interações inter e intramoleculares ou com o solvente também podem influenciar em um

fracionamento químico, devendo este fato ser levado em consideração. A presença de grupos substituintes que concedam às moléculas polaridade mediana é também um fator importante. Estas observações podem ser comprovadas pela presença, ainda que em pequenas quantidades, de compostos distribuídos por todo o cromatograma em todas as frações.

A atividade antioxidante das amostras (CE_{50}): extrato bruto hidroetanólico (150 $\mu\text{g/mL}$), fração hexânica (700 $\mu\text{g/mL}$), fração acetato de etila (250 $\mu\text{g/mL}$) e fração hidroetanólica (50 $\mu\text{g/mL}$), quando comparada ao Trolox[®], demonstra que a mesma é dependente da constituição química das frações. Verifica-se que a maior atividade antioxidante, observada na fração hidroetanólica, coincide com a fração que apresenta maior concentração de fenólicos totais, enquanto no extrato hidroetanólico bruto, que também apresentou um resultado com boa atividade antioxidante, outras substâncias, que não só os fenólicos, estão presentes. A fração acetato de etila apresentou o maior rendimento no fracionamento, com atividade antioxidante não tão evidente. Este fato pode ter ocorrido, pela presença de flavonoides, mas não de outros compostos fenólicos mais polares, presentes na fração hidroetanólica. A fração hexânica apresentou baixo potencial antioxidante, associado ao fato de sua proporção no rendimento do fracionamento químico da amostra ser baixo (1,5 %). Pode-se concluir que esta fração em pouco contribui para a atividade antioxidante, sendo que a possível ausência ou como os fenólicos e os flavonóides, podem ser um indicativo da ausência de atividade antioxidante expressiva.

Um dado que não coincidiu com os geralmente obtidos em literatura foi o observado para a atividade antimicrobiana das amostras. Não houve efeito antimicrobiano de nenhuma das amostras, até a concentração limite de 1mg/mL, concentração acima da qual o ativo em teste não é considerado como um antimicrobiano eficaz. Não é possível atribuir a falta de tal efeito a nenhum dado observado, visto que a amostra foi considerada como estando dentro dos limites instituídos pelos Órgãos responsáveis, no caso do Brasil, o Ministério da Agricultura. Uma possível explicação para a discrepância dos efeitos

antimicrobianos poderia ser a utilização de diferentes cepas de micro-organismos utilizados nos ensaios.

O ensaio de cicatrização não apresentou resultados estatísticos significativos. O uso de ratos saudáveis em ensaios de cicatrização pode ser um dos motivos que colaboram para a dificuldade da utilização de uma metodologia que represente uma situação onde o efeito de aceleração/contribuição do ativo testado no processo cicatricial possa ser melhor evidenciado, visto que alguns autores também não obtiveram diferença estatística significativa entre os grupos avaliados. Os dados da literatura indicam que todos os grupos cicatrizaram totalmente em 14 dias (GARROS *et al*, 2006, VIEIRA *et al*, 2008, SEGUNDO *et al*, 2007, RAHAL *et al*, 2003). Soma-se a esta constatação o fato que nem todos os trabalhos descritos na literatura utilizam uma mesma metodologia; além disso, agentes cicatrizantes são utilizados com maior frequência em feridas crônicas, quando há algum fator que dificulte a cicatrização das lesões.

Também foi observado que em alguns trabalhos o controle negativo (solução fisiológica) apresentou o melhor efeito, mesmo sendo o controle positivo um agente cicatrizante registrado. A análise histológica poderia ter evidenciado diferenças microscópicas no tecido reparado, porém esta não foi efetuada.

A contagem de neutrófilos não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos dentro de um mesmo grupo quando comparados entre si (controles negativos ou positivos), e apresentou diferença quando comparou-se os grupos controle negativos com positivos, o que confirma que o processo inflamatório induzido por LPS foi eficiente. O resultado demonstrou que houve aumento significativo na migração de neutrófilos dos grupos controles positivos (tratamentos+LPS) em relação aos grupos controles negativos (tratamentos). A menor contagem de neutrófilos do tratamento positivo foi da fração hexânica, apresentando 168 neutrófilos/ μ L, ainda assim não é possível afirmar que esta fração apresenta uma atividade significativa sobre a migração de neutrófilos, sendo que o valor ficou bem acima quando comparado com o controle positivo. O extrato hidroetanólico bruto apresentou os maiores valores no controle positivo (NO/ μ L=1599), embora tenha apresentado o menor

valor no controle negativo (NO/ μ L=5). Já que não houve resíduo insolúvel após o fracionamento, não se pode creditar tal constatação a nenhuma classe de moléculas ou substância que tenha induzido a migração de neutrófilos, presente apenas nesta fração.

Não foi observada atividade anti-inflamatória pronunciada em nenhum dos tratamentos, dado que não coincide com os da literatura, onde a atividade anti-inflamatória de amostras de própolis foi demonstrada em outros modelos experimentais (SILVA *et al*, 2012; MENEZES, 2005). Menezes (2005) atribuiu a atividade anti-inflamatória a compostos fenólicos que, devido à sua polaridade mediana, estão presentes em quantidade moderada na fração hidroetanólica. Porém estes não devem ser os únicos compostos com a referida atividade, já que a fração hexânica, ao lado da fração hidroetanólica, apresentou os menores resultados entre os grupos comparados. Verifica-se, entretanto, que ambas frações apresentam diferença qualitativa na constituição química qualitativa, visualizada nos cromatogramas obtidos. A falta de um controle positivo, com atividade anti-inflamatória conhecida pode ser um dos fatores que não permitiu, neste caso, avaliar melhor a capacidade anti-inflamatória dos tratamentos.

Nos trabalhos sobre ensaios de cicatrização consultados, observou-se que o tempo de cicatrização está em torno de 14 dias, não existindo muita variação, o que por si só já demonstra a dificuldade de avaliação dos dados quando estes são baseados apenas na dinâmica de contração da área da ferida. A análise histológica pode ser importante técnica auxiliar para a determinação microscópica da eficiência do processo cicatricial.

As nanocápsulas foram preparadas, e pelos dados mensurados estão de acordo com as especificações necessárias para este tipo de carreador, porém não foram utilizadas nos ensaios de cicatrização, visto que os ensaios efetuados não apresentaram resultados relevantes. Não foram preparadas nanocápsulas com as frações pelo mesmo motivo.

As nanocápsulas de extrato hidroalcoólico liofilizado de própolis nas concentrações de 125, 250, 500 mg e branca, apresentaram resultados satisfatórios e homogêneos para todas as amostras, com distribuição unimodal,

com diâmetro médio entre 220 e 234 nm, índice de polidispersão menor que 0,200 e potencial zeta entre -35,4 e -21,8. Estes dados demonstram que o método de precipitação por polímero pré-formado para a obtenção de nanocápsulas pode ser utilizado com sucesso para a obtenção de um carreador para a incorporação de própolis. Os resultados apontam que o método de quantificação de flavonoides pode ser utilizado em nanocápsulas, embora os dados apresentem o resultado dos flavonoides que foram incorporados às nanocápsulas, desconsiderando-se quando não foram incorporados na matriz polimérica. Os resultados apontam que a incorporação foi eficiente e uniforme entre as amostras.

8. Conclusões

Nos ensaios de cicatrização não houve diferença estatística significativa entre o controle negativo e o extrato e as frações da própolis verde. Observou-se uma tendência à atividade anti-inflamatória nas frações hexânica e hidroetanólica. Os parâmetros físico-químicos da amostra estavam dentro das especificações do Ministério da Agricultura do Brasil. A metodologia para a quantificação das diferentes classes de moléculas está bem estabelecida na literatura, apresentando valores dentro dos especificados. Constatou-se que o fracionamento químico foi eficaz, e houve uma distribuição dos compostos entre as frações, embora algumas moléculas estejam presentes em todas as frações, porém em quantidades diferentes entre si.

Referências

ABREU MATOS, J. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J. PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*, v.4, n.35, 2005.

BANKOVA, V. S. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p114–117, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* n.31, p3–15, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. V.15, 2001

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; RUYZ JORGE, L. L. Therapeutic properties of propolis for treatment of skin lesions. *Acta Paul Enferm.* n.22 v3, p.318-22. 2009.

BARTH, O. M.; DUTRA, V. M. L.; JUSTO, R. L. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil meridional. *Ciência Rural*, v.29, n.4, p.663-667, 1999.

BATISTA DE ALMEIDA, R.; CAMAROTO, J. L.; NAVARRO, D. F.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. KOZŁOWSKI JUNIOR, V. A.; Determinação de flavonóides totais em amostras de própolis. *Publicatio UEPG Ciencias Biologicas e da Saude*. 3 (1) 1997 33-41.

BATISTA, L. L. V.; CAMPESATTO, E. A.; BASTOS DE ASSIS, M. L.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir.* 39(6) 2012; 515-520.

BEZZERA, A. C. A; GONÇALVES, G. M. S. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de formulações cosméticas contendo própolis destinadas a prevenção da acne. In: XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas. Campinas, 2009. **Anais**.

BIANCHINI; I. P. BEDENDO. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogenicas. *Sci. agric.* v. 55 n. 1 Piracicaba Jan./Abr. 1998.

BISPO JUNIOR, W.; MIRANDA, E.O.; ALVINO,A.; ARAUJO,B.; SILVA,D.W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10, jan./jun. 2012.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da agricultura. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília 19 jan. 2001.

BREYER, E. U. **Abelhas e Saúde**. 4ed. Porto União, SC: Uniporto. 1984.

BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.902-908, 2007.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R; SANTOS,C.A.deM.; FARAGO,P.V Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. *Acta Farm. Bonaerense* 23 (4): p477-83, 2004.

CAMARGO, J. M. F. org. **Manual de Apicultura**. Editora Agronômica Ceres São Paulo - SP. 1972

CARNEIRO, H. Pequena **Enciclopédia da História das Drogas e Bebidas**. Elsevier Editota Ltda. RJ 2005

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Própolis, an old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia*, v.73 Suplemento 1 2002.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Propolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova*, v.30, n.7, p.1512-1516, 2007.

CHANG, C-C.; YANG,M-H.; WEN, H-M.; CHERN J-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 10, No. 3, 2002, Pages 178-182

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. V 3. 3ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P. A.; PACHECO, E.; LIMA, I. B.; ABREU, J. A.; PARK Y. K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce*. V.56, Novembro de 2006.

DE VARGAS, A. P.; WITT, N. M.; DA COSTA, M. M.; SÁ E SILVA, M.; VIANA, L. V. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, Santa Maria, v34, n1. 2004.

Disponível em <http://downloads.hindawi.com/journals/ecam/2005/697212.pdf>. Acesso em 30 de junho de 2013.

Disponível em <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2008/835401/abs/> Acessado em: 30 de julho 2013).

DOS SANTOS, C. R.; ARCENOI, F.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO E. M. R. A.; ARAÚJO, G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, I. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.v.13, supl., p.71-74, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. V1. 5.ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FARNESI, A. P. **Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponídeos em microrganismos**. São Paulo, 2007. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

FERNANDES JR. A. SUGUZAKI, M. F.; FOGO, M. L.; FUNARI, S. C. R.; LOPES, C. A. M. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins* v. 1 n. 2, 1995.

FERNANDES JR. A.; LOPES, C. A. M.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Venom. Anim. Toxins* v. 3 n. 2, 1997.

FERNANDES, G. F.; COSTA, C. B. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis verde contra espécies do gênero *Cândida* sp.. *Infarma - Informativo Profissional do Conselho Federal de Farmácia* v.18. 2007.

FISCHER, G.; HUBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela Propolis. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.2, abr./jun, p.247-253, 2008.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**, 2007, São Paulo. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FREIRE, U. C. **Origem da própolis verde e preta produzida em Minas Gerais**. Minas Gerais, 2000. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa.

FREITAS, A. da S.; BARTH O., M.; PINTO DA LUZ, C. F. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. *Revista Brasil. Bot.*, V.33, n.2, p.343-354, abr.-jun. 2010

FURNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v26(1): p171-178, jan.-mar. 2006.

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45 (2007) 390–399

GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.21, supl.3, p.55-66, 2006.

GERALDINI, C. A. C.; SALGADO, E. G. C.; RODE, S. M. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentária - avaliação ultra-estrutural. *Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos*, v.3, n.2, jul./dez., 2000.

GONSALES, G. Z.; ORSI, R. O.; FERNANDES JUNIOR, A.; RODRIGUES, P.; FURNARI, C, S. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V.12, n.2, p.276-284, 2006.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial Properties of Propolis (Bee Glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, v.83, Março 1990.

GREGORY, S. R.; PICCOLO, N.; PICCOLO M. T.; PICCOLO, M. S. HEGGERS, J. P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: A naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *The Journal of alternative and complementary medicine*, v.8, n.1, 2002.

HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. Farm.*, v.88, n.2, 2007.

HIGASHI, K. O., CASTRO, S. L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v.43(2), p149-155. 1994.

<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/46/artigo.htm>, em 30 Julho 2013.

JUNQUEIRA & CARNEIRO, **Histologia Básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KOSALEC, I, PEPELJNJAK, S, BAKMAZ, M., VADIMIR-KNEZEVIC, S., Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharmaceutica* (Zagreb, Croatia), v.55, p.423-430, 2005.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* 64 (235–240)1999.

LIMA, C.R. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo[®]. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.25, p.544-549, 2006.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G. Essencial oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, Vol. 38, No. 2, pp. 381-389, 1995.

LUSTOSA, S. R. Recife, **Padronização de extrato de própolis e avaliação da atividade antimicrobiana**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2007.

MAGALHÃES, M.S.F. **Avaliação do efeito de Dersani[®] e da água de coco liofilizada no modelo cutâneo de cicatrização por segunda intenção em ratos wistar**. Fortaleza, 2007. 179p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará.

MARCUCCI, M. C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Fitos**, v.1, p.36-46, 2006.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**,v.26, p.83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes da própolis. *Química Nova*. v.19, 1996.

MARCUCCI, M.C.; WOISKI, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. *Mensagem Doce - APACAME* n46, 1998 Acessado em:

MARTINEZ, O.A.; SOARES, A.E.E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.13, n.4, 2012

MASSON, B. **Própolis, um antibiótico natural**. Cadernos de vida Natural v8. São Paulo: Ed. Global Ground; 1984.

MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B., Validated method of the quantification of artepilin-C in brasilian propolis. *Phytochemical Analysis*, v.19, 2008.

MELLO DE LIMA, N. **Abelhas e Mel – Criação e extração**. Curso da Apicultura. Edições de Ouro. Ed Tecnoprint Ltda. Rio de Janeiro - RJ 1979.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.3, p.405-411, jul./set., 2005.

MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. G.; KADOTA, S. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Propolis. *Phytochemical Analysis* 12, 366–373 (2001).

MORENO, P. R. H., LIMA, M. E. L., CARUZO, M. B. R., TORRES, D. S. C., CORDEIRO, I., YOUNG, M. C. M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) Leaves. **The Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.190 - 192, 2009.

MUXFELDT, H. **Apicultura para todos**. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, 1985.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the Constituents from the Aerial Part of *Baccharis dracunculifolia* DC. *Chem. Pharm. Bull.* 49(11) 1388—1394, 2001.

NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brasil. *Apidologie*, v.29, 1998.

NOGUEIRA NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

NUNES, L. C. C. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.2b, 2009.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. Piracicaba, 2007. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”.

OLIVEIRA, F. L. R. de . **A Escrita Sagrada do Egito Antigo. Dicionário Hieróglifo-Português**. Ibitirama/ES: Ed. do Autor, 2008, 138p.

OLIVEIRA,V.diC.; BASTOS,E.M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* De. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. *Acta bol. bras.* v12(3), p.431-439, 1998.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI,A. R. P.; AGUIAR,C. L. Propolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; WANG, H.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K. H. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. *Mensagem Doce*, v.56, Maio de 2000.

PEGORINI,F.; MARANHO,L.T.; ROCHA,L.D. Organização estrutural das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae *Revista Brasileira de Farmacognosia.*, v.89(3), 2008.

PEREIRA, A. S; BICALHO, B.; AQUINO NETO, F. R. Comparasion of própolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie*, v34, p.291-298, 2003.

PIETTA, P. G. Flavonóides as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, n.7, 2000.

PONTARA, L. P. de M.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; BETT, V.; NANNI, M. R.; FRANCO, S. L.; LAGO QUITANDA DIAS, J. C.; RODRÍGUEZ, O. A.; VELÁZQUEZ, M. D.; MILIÁN, M. L. Empleo de la tintura de propóleo al 5 % en la cura de heridas sépticas faciales. *Rev. Cubana de Estomatología*, v.34, n.1; ene-jun 1997.

POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, v.64, p.235–240, 1999.

RAHAL, S. C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; TANAKA, C. Y.; GRILLO, T. P.; LEITE, C. A. L. Utilização de própolis em feridas limpas induzidas em ratos. *Archives of Veterinary Science*, v.8, n.1, 2003.

RAMIREZ, O. B; MARTINEZ, J. H; SANTOYO, A. S; TREVINÑO, S. V. Mecanismo de quimiopreencion del ester fenetilico del acido caféico (CAPE) en la iniciacion de un modelo de hepatocarcinogénesis: alteracion de los CYP450. In: **2º Congreso Nacional de Química Médica**. México, sem data.

RAMOS, F.; ALVAREZ, R. Rendimiento de las obreras africanizadas, *Apis mellifera*, productividad de las colonias y produccion de propoleos total y por partes de colmena, valorada mediante cuatro tecnicas productivas em las cuatro

estaciones del año. **Comision Permanente de Tecnologia y Equipo Apicola**, Universidade Estadual de Maringá, 2006

RIGHI, A. A. **Perfil Químico de amostras de Própolis Brasileira**. São Paulo, 2008. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A.; Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl Ester and galangin. *Fitoterapia*, v.73, s.1, 2002.

SAINT-HILAIRE, AUGUSTE DE. **Viagem a Província de São Paulo**. Ed. Itatiaia. São Paulo 1976.

SALATINO, S; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brasil Própolis. *eCAM* 2005; v.2 (1), p.33-38, Disponível em <http://downloads.hindawi.com/journals/ecam/2005/759396.pdf> Acessado em 30 de julho de 2013.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. Advance Access Publication 11 June 2007 *eCAM* 2008;5(3)317–324.

SANTANA A, G. **Produção de própolis por *Apis mellifera* L. (africanizadas) e avaliação do uso do pólen na determinação de sua origem botânica**. Viçosa-MG 2003 Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C.; OLIVEIRA RODRIGUES, R. F. O.; EBERLIN, M. N. Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. *Apidologie*, v.37, p.384-407, 2006.

SAWAYA, A.,C.,H.;**Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. Campinas, SP 2006. Tese de Doutorado. Instituto de Química – UNICAMP.

SCHEREN, OLB JOSE. **Apicultura Racional**. Biblioteca Rural. Livraria Nobel SA 18ed. 1984.

SEGUNDO, A. S.; BOSCO, A. F.; MAIA, D.; RIBEIRO, R. V.; AGUIAR, E.B.H.; CIRILO, D. M.;BUZELLE, S. L.; VEDOVE, T. A. D. Influência do *Aloe vera* e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia*, v.17, n.1 março 2007.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 133, 2011.

SILVA, J.C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L.M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1790–1795, 2012.

SILVA FROZZA, C.O. da; GARCIA, C.S.C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M.D.O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F.F.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O.A.; HENRIQUES, J.A.P.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology* 52, 137–142, 2013.

SILVA, C.C.F. **Análises químicas e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de alecrim.** São Paulo 2008. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências - USP

SILVA, C.C.F.; SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; BREYER, E.D.H.; NEGRI, G. Chemical Profiling of six samples of Brazilian propolis. *Química Nova*, Vol. 36, No. 2, 237-240, 2013.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MEMTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2010, 1104p.

SIMONE-FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41 295–311, 2010.

SOUZA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG) Brasil, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v17(1): p.85-93, Jan./Mar. 2007.

SOUZA, M. C.; SILVA, J. F. M.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R. VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels os Brazilian própolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, v.99, v.3, 2006.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.S.A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *eCAM* v.2(1), p.85–92 2005.

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

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Genero *Baccharis* (Asteraceae) Aspectos Químicos, Economicos e Biológicos. *Química Nova*, Vol. 28, No. 1, 85-94, 2005.

VIEIRA, A. P. SANTOS, N. R. BORGES, J. H. S.; VICENZI, J. H. S.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. Semina Cienc. Biol. Saúde; v.29, n.1, jan.-jun. 2008.

WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of Propolis. *Apidologie*, v.18(4), p.327-334, 1987.

WHO. **Monographs on selected medicinal plants.** v.1, Geneva: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999.

Anexos

Aprovação pela CEUA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/2/2013

Recebemos o certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do(a) Universidade Cruzeiro do Sul, referente ao projeto "Atividade cicatrizante e antiúlcera da própolis verde: estudo envolvendo o fracionamento químico e a análise cromatográfica", de responsabilidade do(a) pesquisador(a) Harry Léo Wysocki Júnior, sob a orientação do(a) Elfriede Marianne Bacchi, que se encontra arquivado nesta secretaria.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Jailson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP