

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE
MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS VISANDO O TRATAMENTO DE
LESÕES CUTÂNEAS À BASE DE FIBRAS DE PLA/PEG E PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDAS POR SOLUTION BLOW SPINNING**

Rebeca Tibau Aguiar Dias

SAPIENTIA AEDIFICAT

João Pessoa – Paraíba – Brasil

Fevereiro/2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE
MATERIAIS

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS VISANDO O TRATAMENTO DE
LESÕES CUTÂNEAS À BASE DE FIBRAS DE PLA/PEG E PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDAS POR SOLUTION BLOW SPINNING**

Rebeca Tibau Aguiar Dias

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPCEM) da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência e Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros

Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

João Pessoa – Paraíba – Brasil

Fevereiro/2019

D541d Dias, Rebeca Tibau Aguiar.

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS VISANDO O TRATAMENTO DE
LESÕES CUTÂNEAS À BASE DE FIBRAS DE PLA/PEG E PRÓPOLIS
VERMELHA PRODUZIDAS POR SOLUTION BLOW SPINNING / Rebeca
Tibau Aguiar Dias. - João Pessoa, 2019.

129 f. : il.

Orientação: Eliton Souto de Medeiros.

Coorientação: Juliano Elvis de Oliveira.

Tese (Doutorado) - UFPB/CT/PPCEM.

1. Nanofibras. 2. Solution Blow Spinning. 3. SBS. 4.
Poli(ácido láctico). 5. PLA. 6. Poli(etileno glicol). 7.
PEG. 8. Própolis vermelha. I. Medeiros, Eliton Souto
de. II. Oliveira, Juliano Elvis de. III. Título.

UFPB/BC

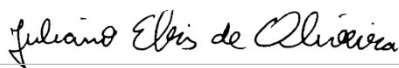
DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS VISANDO O TRATAMENTO DE
LESÕES CUTÂNEAS À BASE DE FIBRAS DE PLA/PEG E PROPOLIS
VERMELHA PRODUZIDAS POR SOLUTION BLOW SPINNING

BANCA EXAMINADORA



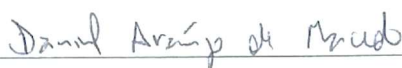
Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros

Orientador - UFPB



Prof. Dr. Juliano Elvis de Oliveira

Co-orientador – UFLA



Prof. Dr. Daniel de Araújo Macedo

Examinador interno - UFPB



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

Examinador externo - UFPB



Prof. Dr. Adillys Marcelo da Cunha Santos

Examinador externo – UFCG



Prof. Dr. Romualdo Rodrigues Menezes

Examinador externo – UFCG



DEDICATÓRIA

A Deus

Porque somente a Ele, por Ele e para Ele seja a glória.

Aos meus pais, Fátima e Erenilton

Por todo o amor, apoio, incentivo e confiança nesta jornada pela vida.

Ao meu irmão

Que apesar de tudo que foi vivenciado durante este período do doutorado, foi por ele que consegui superar minhas dificuldades.

Ao meu esposo, Eduardo

Por toda cumplicidade nos momentos bons e ruins, além do incentivo em lutar até hoje por meus sonhos.

Ao meu filho, Valentino

Novo amor da família.

AMO TODOS VOCÊS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros

Por ter aceitado minha orientação, por todo apoio, conhecimento transmitidos e pelo companheirismo, além de ter tido muita paciência comigo.

Aos professores técnicos e profissionais do Departamento de Engenharia de Materiais e da Escola Técnica de Saúde da UFPB

Pelo suporte e assessoria na execução dos ensaios, contribuições científicas e carinho de colegas.

Ao Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior

Por abrir suas portas para realização deste trabalho.

Aos professores André Ulisses, Ricardo Castro, Hugo Lemes e Roberto Wagner

Por sua paciência e ajuda na tentativa de conciliar o trabalho e a pesquisa.

Aos amigos de laboratório

Lucas, Meyson, Eudes, Vinícius, Kaline, Tatiana, Camila, Aline, Tarcísio, Teresa, Panmela, Jefferson, Patrícia e Roberta por sempre estarem a postos para colaborar na execução dos ensaios, discutir resultados, conversar e dar boas risadas.

Aos professores convidados da banca

Pelas suas sugestões e discussões com a finalidade de melhorar este trabalho.

Meus amigos da vida

Que por muitas vezes não pude encontrar, mas sei que estavam a todo tempo torcendo por mim.

Muitíssimo obrigada! Sem vocês esse trabalho não existiria

E Deus os abençoou, e Deus lhes disse: Frutificai e multiplicai-vos, e enchei a terra, e sujeitai-a; e dominai sobre os peixes do mar e sobre as aves dos céus, e sobre todo o animal que se move sobre a terra.

Gênesis 1:28

RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico complexo com a finalidade de restaurar o tecido após algum trauma. Essa área é de grande interesse no desenvolvimento de curativos para lesões associando biomateriais com princípios ativos naturais. Logo, este trabalho caracterizou o extrato etanólico de própolis vermelha (PV), otimizou o desenvolvimento de fibras de poli(D-ácido láctico) (PLA) e produziu fibras através das blendas de PLA com poli(etileno glicol) (PEG) em diferentes proporções (m/m) (PLA:PEG 100:0, 90:10, 80:20 e 70:30) incorporadas com 16% m/m de PV pelo sistema de *Solution Blow Spinning* (SBS) com o propósito de cicatrizar ferimentos cutâneos. Avaliou-se a atividade antioxidante e antimicrobiana da própolis vermelha e se caracterizou as propriedades das fibras por: MEV; físico-química por TGA, FTIR e DRX; adsorção, eficiência de encapsulação e liberação dos flavonoides da PV por UV-vis; microbiológicas pela cinética de crescimento de *Staphylococcus aureus*; e imunológicas por citotoxicidade com diferentes concentrações de PV, estresse oxidativo através de espécies reativas de oxigênio (EROs) e modulatória de citocinas. As soluções de PLA foram dissolvidas em dimetilcarbonato (DMC) nas concentrações 8, 10 e 12% m/v e fiadas nas taxas 80, 100 e 120 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, em que se observou que a concentração polimérica foi fator determinante para o aumento do diâmetro das fibras de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Da condição otimizada, as fibras de PLA contendo PEG apresentaram superfícies lisas com poucos *beads*. As mantas com PV apresentaram liberação sustentada em função do tempo, com exceção da 70PLA.PV. Em relação ao crescimento de *S. aureus*, observou-se que este micro-organismo foi inibido em diferentes tempos para cada proporção de PLA/PEG. Na avaliação imunológica, as fibras com menos de 1% m/m de PV apresentaram viabilidade celular superiores a 75% quando em contato com células mononucleares periféricas sanguíneas, baixa formação de EROs e modulação de IL-4 e IL-10 na presença de PHA. Conclui-se que as fibras de PLA/PEG com PV possuem potencial para auxiliar o processo cicatricial de feridas devido à sua inibição microbiana associada à viabilidade celular e modulação de citocinas com diferentes modos de atuação em função de sua molhabilidade e liberação controlada de PV.

Palavras-chave: nanofibras, *Solution Blow Spinning*, SBS, poli(ácido láctico), PLA, poli(etileno glicol), PEG, própolis vermelha

ABSTRACT

Wound healing is a complex physiological process whose goal is to restore the tissue after a trauma. This area is of great interest in the development of wound dressings through the association of biomaterials with natural active principles. In this work we characterized the red propolis ethanolic extract (RP), optimized the development of fiber mats made of poly(D-lactic acid) (PLA) and produced fibers of PLA and poly(ethylene glycol) (PEG) blends in different proportions (w/w) (PLA:PEG 100:0, 90:10, 80:20 and 70:30) containing 16% w/w of RP by the solution blow spinning (SBS) system with the purpose of healing cutaneous wound. RP was evaluated through its antioxidant and antimicrobial activities and the fiber properties were characterized by SEM; physical-chemical by TGA, FTIR and XRD; adsorption, encapsulation efficiency and RP's flavonoids release by UV-vis; microbiological by *Staphylococcus aureus* growth kinetics; and immunological by cytotoxicity with different RP concentrations, oxidative stress through reactive oxygen species (ROS) and cytokine modulation. PLA solutions were dissolved in dimethylcarbonate (DMC) in 8, 10 and 12% w/v concentrations and spun at 80, 100 e 120 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Results show that the polymeric concentration was the main factor to increase the fiber diameters statistically ($p<0,05$). From optimized condition, PLA fibers with PEG showed smooth surfaces and few beads. The mats with RP showed sustained release in time function, but 70PLA.20RP. In relation to *S. aureus* growth, it was observed that this microorganism was inhibited in different times to each PLA/PEG proportion. In the immunologic evaluation, fibers with less than 1% w/w of RP showed cellular viability greater than 75% in contact with peripheral blood mononuclear cell, low reactive oxygen species (ROS) formation and IL-4 and IL-10 modulation in PHA presence. PLA/PEG with RP fibers have the potential to assist the healing process to their microbial inhibition associated to cellular viability and cytokine modulation with different actuation modes in function of its wettability and controlled release of RP.

Keywords: nanofibers, Solution Blow Spinning, SBS, poly(lactic acid), PLA, poly(ethylene glycol), PEG, red propolis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3-1. Os principais anexos da epiderme e derme.....	19
Figura 3-2. Fases da cicatrização de feridas	20
Figura 3-3. Gráfico comparativo entre administração de fármacos pelo método tradicional e com liberação controlada	25
Figura 3-4. Polímeros como materiais de parede promovendo encapsulação ou distribuição do princípio ativo na fibra.....	26
Figura 3-5. Tipos de degradação dos polímeros biodegradáveis. (a) Erosão (b) Degradação em massa (c) Degradação em massa com autocatálise.	27
Figura 3-6. Sistema de fiação por sopro em solução (SBS)	29
Figura 3-7. Sistema de bicos concêntricos do SBS	30
Figura 3-8. Possíveis morfologias de fibras (a) lisas, (b) com <i>beads</i> , (c) porosas e (d) tipos de regime em soluções poliméricas	31
Figura 3-9. Biomimetização das nanofibras acomodando células para formação de tecido	33
Figura 3-10. Produção do ácido láctico através de refino de petróleo	36
Figura 3-11. Síntese do PLA	37
Figura 3-12. Estruturas quirais do ácido láctico.....	37
Figura 3-13. Síntese do PEG	40
Figura 3-14. a) Própolis vermelha. b) Exsudato do caule da planta c) rabo-de-bugio ...	42
Figura 3-15. Principais antioxidantes presentes na própolis vermelha	43
Figura 4-1. Fluxograma dos ensaios realizados neste trabalho	47
Figura 4-2. (a) Própolis vermelha macerada, (b) extratos de PV em etanol após decantação de ceras, (c) rotaevaporação e (d) extrato seco de PV	49
Figura 4-3. Esquema do ensaio de teor de fenóis	52
Figura 4-4. Esquema do ensaio de teor de flavonoides	53
Figura 4-5. Esquema do ensaio de DPPH	54
Figura 4-6. Esquema do ensaio do FRAP	55
Figura 4-7. Desenho esquemático da leitura visual após aplicação da resazurina sódica.	58
Figura 4-8. Esquema da porcentagem de PV adsorvido e encapsulado nas fibras.....	60
Figura 4-9. Esquema do ensaio de liberação controlada <i>in vitro</i>	61

Figura 4-10. Esquema da cinética de inibição	62
Figura 4-11. Esquema do ensaio de viabilidade celular	64
Figura 4-12. Esquema do ensaio de estresse oxidativo	65
Figura 5-1. Determinação de marcadores do extrato etanólico de PV por CLAE.	70
Figura 5-2. Morfologia e distribuição dos diâmetros das fibras de PLA nas variáveis concentração e taxa de injeção. Fibra 8% m/v PLA em (a) 80 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ e (b) 120 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$; (c) 10% m/v PLA em 100 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$; 12% m/v PLA em (d) 80 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ e (e) 120 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$	73
Figura 5-3. Diâmetro das fibras de PLA nas variáveis concentração e taxa de injeção .	74
Figura 5-4. Diagrama de Pareto em relação aos parâmetros avaliados para a fiação das fibras de PLA.....	75
Figura 5-5. Valores previstos e observados para o diâmetro médio das fibras	76
Figura 5-6. Micrografias das fibras de (a) 100 PLA (b) 90PLA (c) 80PLA (d) 70PLA (e) 100PLA.PV (f) 90PLA.PV (g) 80PLA.PV e (h) 70PLA.PV	78
Figura 5-7. Diâmetros das mantas de PLA/PEG sem e com PV	79
Figura 5-8. FTIR do PEG e das fibras de PLA/PEG	80
Figura 5-9. Espectro de FTIR da própolis e das fibras de PLA/PEG com PV	81
Figura 5-10. Padrões de DRX para o PEG e as fibras de PLA/PEG	83
Figura 5-11. DRX da própolis e das fibras de PLA/PEG com PV	84
Figura 5-12. Curvas TG e DTG do PEG e das fibras PLA/PEG	85
Figura 5-13. Curvas TG e DTG do PV e das fibras PLA/PEG com PV	87
Figura 5-14. Ângulos de contato das fibras de PLA/PEG	89
Figura 5-15. Ângulos de contato das fibras de PLA/PEG com PV	90
Figura 5-16. Liberação controlada da PV nas fibras de PLA em função do tempo (a) por dissolução e (b) cumulativo	93
Figura 5-17. Cinética de inibição do <i>S. aureus</i> no extrato de PV e nas mantas de PLA/PEG/PV	96
Figura 5-18. Viabilidade celular de PBMC em diferentes concentrações de PV	97
Figura 5-19. Viabilidade celular de PBMC em mantas de PLA/PEG contendo diferentes porcentagens de PV (m/m) em relação à massa dos polímeros	98
Figura 5-20. a) Avaliação de EROs em função do tempo e b) geração de EROs estimulados com zimosan opsonizado	101

Figura 5-21. Liberação de citocinas por células de PBMC incubadas com PV e as fibras de 80PLA e 80PLA.PV. Titulação de a) IL-4, b) IL-6, c) TNF- α , d) TGF- β e e) IL-10.	104
Figura A0-1. Curva analítica dos fenóis totais	121
Figura A0-2. Curva analítica dos flavonoides totais	121
Figura A0-3. Curva analítica dos flavonoides totais	122
Figura A0-4. Curva analítica dos flavonoides totais por dissolução	122
Figura A0-5. Fotografias das mantas de PLA/PEG sem e com PV	124 125
Figura A0-6. Unidades de colonias formadas pelo S. aureus em contato com as fibras	125 126

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1. Etapas das cicatrizações de feridas.....	21
Tabela 4-1. Planejamento experimental 2^2 para as fibras de PLA com as variáveis concentração <i>versus</i> taxa de injeção	50
Tabela 5-1. Fenóis e flavonoides totais do PV	67
Tabela 5-2. Avaliação da atividade antioxidante do PV pelos métodos de DPPH e FRAP	69
Tabela 5-3. Valores de CIM e CBM do extrato de própolis em etanol.....	71
Tabela 5-4. Coeficientes do modelo de regressão linear proposto para o diâmetro médio das fibras.....	75
Tabela 5-5. ANOVA dos efeitos da concentração de PLA e da taxa de injeção no diâmetro das fibras de PLA	76
Tabela 5-6. T_{onset} , T_{pico} e perda de massa ds mantas PLA/PEG.....	85
Tabela 5-7. T_{onset} , T_{pico} e perda de massa ds mantas PLA/PEG com PV.....	87
Tabela 5-8. Concentração de PV adsorvido na superfície (AS) da fibra e a eficiência de encapsulação (EE)	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA = Análise de variância

BHI = Brain Heart Infusion

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (em inglês, High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

DMC = Dimetilcarbonato

DPPH = 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DRX = Difração de Raio-X

DSC = Calorimetria Exploratória Diferencial

DTG = Derivada da curva termogravimétrica

EE = Eficiência de Encapsulação

EROs = Espécies Reativas de Oxigênio

EtOH = Etanol

FDA = Food and Drug Administration

FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Potential (poder antioxidante para redução férrica, do inglês)

HBV = Hepatitis B Virus (vírus da hepatite B, do inglês)

HCV = Hepatitis C Virus (vírus da hepatite C, do inglês)

HIV = Human Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência humana, do inglês)

IL = Interleucina

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

M_n = Massa molar

NADPH = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced (Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Reduzida, do inglês)

PBMC = Peripheral Blood Mononuclear Cells (células sanguíneas mononucleares periféricas, do inglês)

PBS = Phosphate Buffer Solution (Solução de tampão fosfato, do inglês)

PCL = Poli(ϵ -caprolactona)

PEG = Poli(etilenoglicol)

PEO = Poli(oxietileno)

pH = Potencial hidrogeniônico

PLA = Poli(D,L-ácido láctico)

PLGA = Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

PMN = Polymorphonuclear neutrophil (neutrófilo polimorfonuclear, do inglês)

PV = Própolis vermelha

ROS = Reactive Oxygen Species (espécies de oxigênio reativo, do inglês)

SBS = Solution Blow Spinning (fiação por sopro em solução, do inglês)

t-BHP = *Tertiary Butyl Peroxide* (peróxido de butilo terciário, do inglês)

TGA = Termogravimetria

TGF- β = Transforming Growth Factor Beta (fator de transformação de crescimento, do inglês)

TNF- α = Tumor Necrosis Factor Alfa (fator de necrose tumoral, do inglês)

TPTZ = 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine

TR = Tempo de retenção

UFC = Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Justificativa do trabalho	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivos Gerais	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	Cicatrização de feridas.....	19
3.2	Biomateriais	23
3.3	Sistemas de Liberação Controlada.....	24
3.4	Fibras micro- e nanoestruturadas por <i>Solution Blow Spinning</i>	27
3.5	Nanofibras no tratamento de feridas	32
3.6	Ácido Polilático (PLA)	35
3.7	Polietilenoglicol (PEG).....	39
3.8	Própolis	40
3.9	Própolis no tratamento de feridas	44
4	EXPERIMENTAL	47
4.1	Materiais	48
4.2	Métodos	48
4.2.1	Própolis vermelha.....	48
4.2.1.1	Limpeza e preparo das amostras de própolis vermelha <i>in natura</i>	48
4.2.1.2	Preparação dos extratos	49
4.2.2	Fiação por SBS	50
4.3	Caracterizações	51
4.3.1	Própolis vermelha.....	51
4.3.1.1	Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu...	51
4.3.1.2	Determinação do teor de flavonoides totais.....	52
4.3.1.3	Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH	53
4.3.1.4	Atividade antioxidante pelo poder redutor do ferro FRAP.....	54
4.3.1.5	Determinação dos marcadores do extrato etanólico de PV por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	55

4.3.1.6	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	56
4.3.2	Fibras por SBS.....	58
4.3.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	58
4.3.2.2	Infravermelho com Transformada de Fourier.....	59
4.3.2.3	Difração de Raio X (DRX)	59
4.3.2.4	Termogravimetria	59
4.3.2.5	Ângulo de contato estático com água	59
4.3.2.6	Adsorção na superfície e eficiência de encapsulamento.....	59
4.3.2.7	Perfil de liberação in vitro	61
4.3.2.8	Cinética de inibição de <i>Staphylococcus aureus</i>	62
4.3.2.9	Citotoxicidade	63
4.3.2.10	Estresse oxidativo.....	64
4.3.2.11	Dosagem de citocinas	65
4.4	Análise estatística	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	Própolis vermelha	67
5.1.1	Rendimento do extrato etanólico de própolis vermelha	67
5.1.2	Determinação de fenóis totais e flavonoides totais	67
5.1.3	Avaliação da atividade antioxidante.....	68
5.1.4	Determinação dos marcadores do extrato etanólico de PV por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	69
5.1.5	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	70
5.2	Mantas de PLA/PEG sem e com PV	71
5.2.1	Otimização dos parâmetros de fiação para as fibras de PLA	71
5.2.2	Mantas de PLA/PEG e PLA/PEG com PV	77
5.2.3	Infravermelho com Transformada de Fourier	79
5.2.4	Difração de Raio X.....	82
5.2.5	Termogravimetria	84
5.2.6	Ângulo de contato estático com água	88
5.2.7	Adsorção na superfície e eficiência de encapsulação	91
5.2.8	Perfil de liberação in vitro	92
5.2.9	Cinética de inibição de <i>Staphylococcus aureus</i>	95

5.2.10	Citotoxicidade.....	97
5.2.11	Estresse oxidativo	99
5.2.12	Modulação de citocinas	103
5.3	CONCLUSÕES	106
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	107
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
	APÊNDICE	121

1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão que serve como barreira de proteção dos órgãos internos contra potenciais perigos do ambiente. Quando há lesões, o processo de cicatrização se inicia de forma altamente orquestrada por uma cascata de eventos fisiológicos, uma vez que este órgão possui propriedade regenerativa eficaz. Contudo, infecções e baixo suprimento de sangue na ferida podem atrasar o processo cicatricial [1,2].

As feridas são classificadas em agudas ou crônicas. As agudas podem ser causadas por incisão cirúrgica, térmica, abrasão ou laceração, sendo sua cicatrização completada em um período previsível de tempo e sem intervenções significantes. Já nas crônicas, o processo cicatricial falha e sua reparação não se realiza com êxito. Usualmente estes ferimentos estão associados a outras patologias, como nas úlceras vasculares (venosas ou arteriais), úlceras diabéticas ou úlceras de pressão [3,4]. Geralmente, as lesões crônicas compartilham características comuns como excesso de citocinas pró-inflamatórias, ROS, proteases e células senescentes, assim como a existência persistente de infecção e inabilidade de as células da derme e/ou epiderme responderem ao estímulo reparativo [4,5].

A escolha do tratamento depende da avaliação das feridas de cada paciente. Elas podem ser tratadas com curativos tópicos constituídos por materiais sintéticos ou naturais e classificados como tradicionais (gaze, bandages, algodão), modernos (filmes semi-permeáveis, hidrogéis) ou biológicos (líquido amniótico de égua, peritônio equino ou matrix extracelular) [6,7]. Para casos mais graves, pode-se necessitar de cirurgias complexas e revascularização. Terapias avançadas como a pressão negativa (NPWT, do inglês *negative pressure wound therapy*), oxigênio hiperbárico (HBOT, do inglês *hyperbaric oxygen therapy*), substituição de pele e terapias baseadas em células são aplicadas nos casos em que a cicatrização não é efetivada em 4 semanas de tratamento [4,5,8].

No caso de curativos, para que estes possuam ação eficaz no tratamento de lesões cutâneas, suas propriedades devem promover e manter a umidade natural; melhorar a migração epidérmica, a angiogênese e a síntese do tecido conjuntivo; permitir trocas gasosas entre o tecido ferido e o ambiente externo; manter a temperatura apropriada para facilitar o fluxo sanguíneo para o ferimento; proteger de infecção bacteriana; ser estéril, não tóxico e não alergênico [6]. Neste contexto, a arquitetura de curativos com inclusão

de princípios ativos e sua liberação controlada é uma estratégia interessante para que as feridas cicatrizem eficientemente.

As terapias de liberação controlada se utilizam de veículos para dirigir agentes bioativos até o local alvo de atuação, controlar sua liberação, diminuir os efeitos tóxicos e/ou aumentar o índice terapêutico a partir da modificação de sua farmacocinética [9,10]. Os polímeros são estruturalmente versáteis, permitindo adequá-los de acordo com a aplicação requerida [11–13]. Esta associação com ativos sintéticos, homeopáticos ou fitoterápicos podem aprimorar os tratamentos convencionais da área da saúde e inovar os dispositivos de liberação controlada [14].

Neste contexto, as fibras não tecidas em dimensões micro- e nanométricas são uma possibilidade para a recomposição de tecidos no corpo devido ao aumento da sua área superficial (largura/diâmetro), que promove o aumento da reatividade do dispositivo de liberação controlada, com a vantagem de se obter o mesmo efeito de um produto em macroescala nas mesmas condições de estudo [15,16], além de mimetizar a estrutura da matriz extracelular, que pode servir de suporte para a proliferação celular [17].

A incorporação de agentes bioativos nestas mantas podem acelerar o processo cicatricial. A própolis vermelha de Alagoas, que é encontrada nas regiões de mangue, tem sido avaliada com potencial ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante [18–20]. Nesse sentido, a encapsulação de própolis pode inibir o crescimento bacteriano, diminuir os níveis plasmáticos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e atuar na anti-inflamação das feridas devido à sua grande concentração de flavonoides [21–23].

Desta forma, este trabalho tem por objetivo a obtenção de fibras micro- e nanoestruturadas de poli(D-ácido láctico)(PLA) com poli(etileno glicol)(PEG) incorporadas com extrato etanólico de própolis vermelha (PV) através da técnica de fiação por sopro em solução (*Solution Blow Spinning* – SBS, em inglês) e estudar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos destas fibras.

1.1 Justificativa do trabalho

Feridas não cicatrizadas com grande área de extensão, com infecção ou ferimentos crônicos não só impossibilita as funções fisiológicas de barreira da pele quanto podem prejudicar a morbidade e até levar a morte [4]. Neste contexto, várias estratégias para melhorar a cicatrização destes tipos de lesão vem sendo estudadas. A proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de curativos cutâneos para o tratamento de feridas

baseados em fibras micro- e nanoestruturadas de PLA com PEG e incorporadas com própolis vermelha. As mantas possuem potencial em promover proliferação celular sobre a ferida devido à sua semelhança estrutural com a matriz extracelular [17] e por promover as condições apropriadas para que haja troca gasosa e de umidade entre a lesão e o ambiente externo [24]. Sua associação à PV promove a liberação controlada deste agente bioativo, promovendo a aceleração do processo cicatricial através de sua ação inibitória contra *Staphylococcus aureus*, que é um dos micro-organismos responsáveis por infecção bacteriana; além de reduzir os níveis plasmáticos de espécies reativas de oxigênio (EROs), que estão relacionados ao retardo da cicatrização. A produção destes curativos por *Solution Blow Spinning* é interessante devido à possibilidade de as mantas poderem ser obtidas e coletadas diretamente no local da ferida, sem prejuízo à área lesionada [25].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Produzir micro- ou nanofibras de PLA/PEG incorporadas com extrato etanólico de própolis vermelha (PV) produzidas por SBS e avaliar suas propriedades físicas, químicas, sua ação antimicrobiana, citobiocompatibilidade, estresse oxidativo celular e resposta imunológica.

2.2 Objetivos Específicos

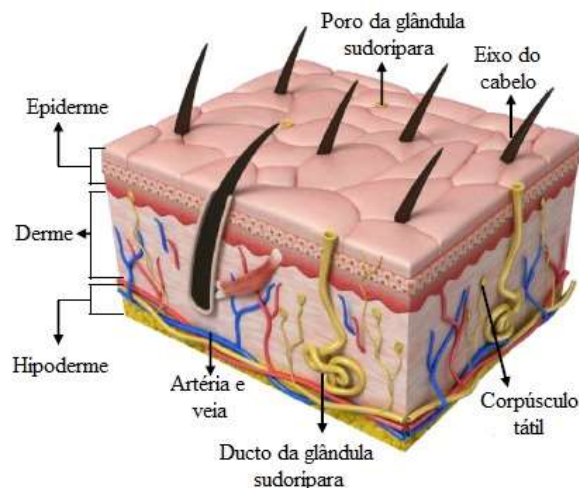
- Desenvolver mantas de nanofibras de PLA/PEG nas proporções 100/0, 90/10, 80/20 e 70/30 incorporadas com extrato etanólico de PV por SBS;
- Caracterizar os parâmetros morfológicos (MEV), térmicos (TGA), espectroscópicos (FTIR), difratométricos (DRX) e molhabilidade das mantas;
- Avaliar os perfis de liberação *in vitro* da própolis vermelha nas mantas de PLA/PEG em tampão fosfato (PBS);
- Avaliar a cinética de crescimento do *S. aureus* (ATCC 25923) nas mantas de PLA/PEG incorporadas com PV;
- Determinar a viabilidade celular de fibras com diferentes concentrações de PV;
- Examinar a influência das fibras sem e com PV na geração de espécies reativas de oxigênio por luminescência;
- Investigar o perfil de citocinas por células mononucleares do sangue periférico de humanos (PBMC) quantificadas pelo método de Elisa sanduíche das mantas de PLA/PEG incorporadas com PV.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cicatrização de feridas

A pele é o maior órgão do corpo humano, cujas funções são de proteção, sensibilidade, respiração, excreção e regulação térmica. A camada mais externa é a epiderme que é formada pelo tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado. Abaixo desta, encontra-se o tecido conjuntivo denominado derme. A hipoderme é uma camada de tecido conjuntivo frouxo localizado abaixo da derme (Figura 3-1) [12,24].

Figura 3-1. Os principais anexos da epiderme e derme



Fonte: Lee *et al.* [26]

A epiderme contém apêndices essenciais, como os folículos capilares associados às glândulas sebáceas (unidade pilossebácea), glândula sudorípara écrina e glândula apócrina. A derme recebe o maior suprimento de sangue para a pele devido à presença das artérias e veias, além de outros apêndices, incluindo as glândulas apócrina, écrina e os folículos capilares. Esta camada é dividida em derme superficial e reticular profunda. A hipoderme é constituída por tecido adiposo, fazendo divisa entre a derme e os músculos [1,12].

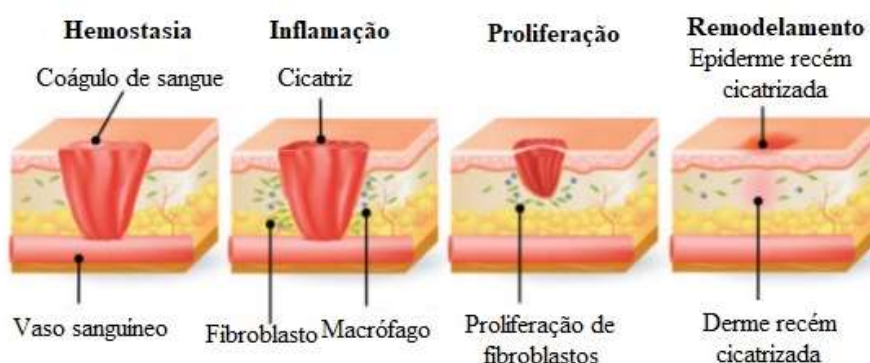
Os queratinócitos compõem 95% da epiderme, sua replicação ocorre no estrato basal. São esses queratinócitos da camada basal os responsáveis pela cicatrização de feridas dérmicas por serem células relativamente indiferenciadas, têm largo potencial de

proliferação e capacidade de autorrenovação. Quando ocorrem queimaduras ou procedimentos abrasivos na pele, estas células podem ser destruídas, dificultando a cicatrização. Caso as glândulas apócrinas e unidades pilosebáceas sejam danificadas, pode haver formação de cicatriz. O mesmo acontece se a lesão se estender até a derme reticular profunda, requerendo até reparo com enxertos e retalhos [1,27].

A ruptura da integridade da pele, superfícies mucosas ou órgãos resulta na formação de ferida. De acordo com a Associação Europeia de Conduta de Feridas (*European Wound Management Association*, em inglês), o termo “ferida” se refere a um corte ou rompimento na continuidade da pele devido à um acidente ou operação [28]. O trauma à pele pode ser causado por energia térmica, elétrica, agentes físicos, químicos, entre outras. Doenças como diabetes e infecções por patógenos também causam sérias lesões devido à diminuição da circulação sanguínea [12,29].

Na hora da injúria, vários mecanismos intra e extracelular são ativados, de maneira regulada e coordenada, com o objetivo de regenerar o tecido. Em geral, as etapas de cicatrização de feridas ocorrem sequencialmente e se sobrepõem em: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelamento do tecido (Figura 3-2 e Tabela 3-1) [1,12,24,27,29–32]. Tanto na cicatrização por primeira quanto na por segunda intenção (quando a lesão é grande e infectada), os mecanismos se diferenciam quantitativamente, não qualitativamente.

Figura 3-2. Fases da cicatrização de feridas



Fonte: INOVA Newsroom [33]

Tabela 3-1. Etapas das cicatrizações de feridas

Inflamação	Debridamento	Proliferação	Maturação
0 a 3 dias	1 a 6 dias	3 a 14 dias	14 dias a 1 ano
Alteração da permeabilidade vascular	Proliferação de polimorfonucleares	Angiogênese = proliferação capilar	Involução do número de capilares
Deposição de fibrina	Atividade de linfócitos e macrófagos	Fibrinólise = reabsorção de fibrina	Involução do número de células
Exsudação	Atividade enzimática	Proliferação de fibroblastos	Aumento da deposição de colágeno
Edema	Limpeza	Modificação da substância básica	Aumento da resistência da cicatriz
	Supuração	Síntese de colágeno	Contração cicatricial
		Migração epitelial	

Fonte: Vidor e Contesini [34]

A hemostasia é a fase inicial que ocorre dentro de segundos a minutos depois da ruptura. Inicialmente há sangramento sobre a ferida, fazendo com que as plaquetas cubram toda extensão liberando seus grânulos para iniciação da coagulação extrínseca e intrínseca, promovendo a hemostasia, e liberando citocinas e quimiocinas para atrair células inflamatórias e ativar as fases seguintes. Há dilatação ao redor dos vasos sanguíneos e os pequenos vasos para liberação de leucócitos, células vermelhas e proteínas do plasma [1].

A presença de dor, calor e rubor é característica da fase inflamatória junto com a organização temporária da matriz extracelular, para a migração celular, funcionando como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial. Esta etapa se inicia pela ação dos neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o local lesionado. Os macrófagos chegam através dos co-produtos da apoptose dos neutrófilos, que por sua vez são as primeiras células a chegar ao ferimento e permanecem até o segundo dia [27,32].

Junto com os linfócitos, os macrófagos têm a função de limpar detritos e bactérias. A infiltração dos macrófagos pode acontecer em aproximadamente 48 horas depois do ferimento e permanecer até o fim da fase inflamatória (em média até o 10º dia). Esta etapa é necessária para o processo de cura e no combate a infecções, sua inibição (através de medicamentos anti-inflamatórios) pode resultar em uma cicatrização imprópria. A inflamação pode se tornar crônica, prejudicial ao reparo ou deixar mais cicatrizes se for interrompida ou prolongada (maior que 3 semanas). Os fatores que podem alongar anormalmente esse estágio incluem uma alta carga bacteriana (superior a 10^5 micro-organismos por grama de tecido), trauma repetido e persistência de material estranho no local. Assim que a ferida for desbridada, a fase de proliferação se inicia [1,30].

O estágio de proliferação acontece através da reepitelização, envolvendo o brotamento capilar e produção da matriz extracelular para preencher os defeitos deixados do desbridamento da ferida. Esta etapa é marcada pela proliferação e influxo dos queratinócitos próximos às beiradas da ferida. Quando estes se encontram com o mesênquima da matriz extracelular, eles se juntam no interior da ferida começando a formar uma nova membrana basal. Depois disso, uma nova linha de queratinócitos migra sobre esta membrana para preencher o defeito. Isto ocorre sucessivamente até o preenchimento da abertura quando há uma sinalização pela inibição de contato entre queratinócitos vizinhos [29,32].

A reepitelização protege a ferida de infecções e dessecação. Durante este processo, uma camada de exudato desinfetado sai sobre a ferida para prover fatores de crescimento essenciais para cicatrização. Qualquer curativo que destrua essa camada saudável resulta em atraso na reparação do tecido. Embaixo do processo de reepitelização, o mesênquima da matriz extracelular continua a se estabelecer através do tecido de granulação. Sob a influência do fator de crescimento vascular endotelial, a angiogênese começa com a formação de novos vasos sanguíneos ao redor da ferida. O tecido granular consiste de fibroblastos, brotamento de novos vasos e colágeno imaturo (tipo III). Alguns fibroblastos começam a se diferenciar em miofibroblastos que se contraem com a intenção de fechar as bordas da ferida [1,12,30,32].

A fase de remodelamento começa pela substituição do mesênquima da matriz celular e do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I e as células remanescentes nas etapas anteriores entram em apoptose, fazendo com que a tensão da ferida aumente dramaticamente. Para que este estágio tenha êxito, é necessário um equilíbrio entre a síntese e a lise de nutrientes. Excesso de fibrose resulta em cicatriz hipertrófica (limitada

a área da ferida) ou na formação de quelóide (extensão fora das bordas). Este estágio dura meses ou anos e é responsável para diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. No fim, a cicatriz terá aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, será plana e não volumosa [27,30,32].

Desta forma, o desenvolvimento de dispositivos tópicos com aplicação no tratamento de feridas deve possuir: ação antimicrobiana para minimizar ou eliminar infecções bacterianas, manter a ferida hidratada e com sangue, permitir migração celular, promover regeneração dérmica e epidérmica, e ao mesmo tempo ter boa adesão à região ferida, ser poroso o suficiente para conduzir a difusão de excreções e nutrientes, ser barato e de fácil manuseio [12,29,31]. Neste contexto, nanofibras produzidas com biomateriais incorporados à fármacos, seja sintético ou natural, podem ser dispositivos interessantes no reparo de tecidos [24].

3.2 Biomateriais

De acordo com a definição empregada pelo Instituto Nacional Americano de Saúde, biomateriais pode ser descrito como “qualquer substância ou combinação de substâncias de origem natural ou sintética que pode ser usada em qualquer período de tempo, que estimula ou repõe parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo com objetivo de manter ou melhorar a qualidade de vida de um indivíduo” [35].

Neste contexto, os biomateriais podem ser classificados de acordo com seu comportamento fisiológico em [11,36,37]:

- **Bioinertes:** mantêm suas propriedades físicas e mecânicas. São bem toleradas quando implantadas no organismo com formação de envoltório fibroso mínimo. O material libera pouco de seus componentes. Possuem pouca susceptibilidade de causa reações biológicas adversas devido à sua estabilidade. Exemplos: cerâmicas à base de carbono, alumina e zircônia.
- **Biotoleráveis:** são tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de envoltório fibroso. Isto acontece devido à liberação de seus compostos (íons, degradação ou corrosão). Exemplos: maioria dos polímeros sintéticos e metais.

- Bioativos: interagem com o tecido circundante, estimulando cicatrização como se fosse um tecido natural, sendo comum no tecido ósseo (osteointegração). Exemplos: vidros bioativos, vitrocerâmicas e cerâmicas de fosfato de cálcio.
- Bioabsorvíveis: são materiais que se degradam, são solubilizados ou fagocitados pelo organismo sendo lentamente substituídos por células em crescimento. São de interesse cirúrgico devido à não necessidade de um outro procedimento para remoção do material implantado. Exemplos: fosfato tricálcico e polímeros naturais.

Logo, durante a etapa de desenvolvimento de um biomaterial são avaliadas, por exemplo, permeabilidade à água, afinidade às proteínas, biodegradabilidade e, principalmente, a disponibilidade de grupos funcionais reativos para reações diretas com o tecido vivo e as modificações químicas destes para tal ação. Estas etapas existem com a finalidade de comprovar a eficácia da aplicação destes dispositivos nos organismos, caracterizando, assim, sua biocompatibilidade, esterilizabilidade, baixa toxicidade, baixo riscos de alergias, sua resistência à corrosão e ao desgaste [12,38,39].

A biocompatibilidade pode ser compreendida como a resposta da interação do dispositivo biomaterial quando em contato com os tecidos ou fluidos do organismo, respondendo apropriadamente à sua aplicação com diminuição de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas [12]. Quanto à esterilização de biomateriais, são utilizados métodos de assepsia com a finalidade de eliminar ou destruir todas as formas de micro-organismos presentes que possam acometer infecções e/ou diminuição do poder atuante do dispositivo biomaterial. Geralmente, utilizam-se de autoclavagem, gás de óxido de etileno ou raios UV ou gama [38,40].

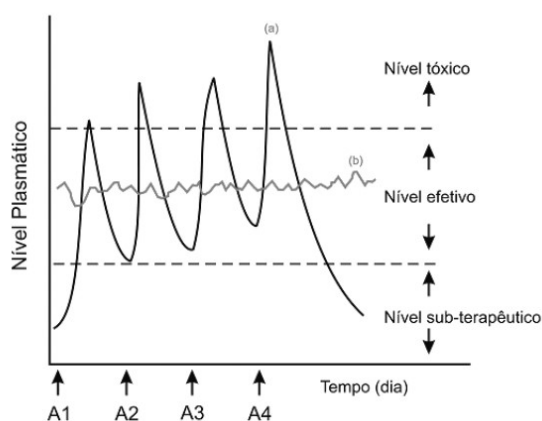
3.3 Sistemas de Liberação Controlada

Os medicamentos podem conter um ou mais princípios ativos, administrados na forma farmacêutica sólida, semissólida ou líquida com finalidade profilática, terapêutica ou diagnóstica [41]. Estes seguem rígidos controles de qualidade industriais em relação à quantidade e pureza dos fármacos, assim como sua estabilidade desde a produção até o consumo para conferir segurança e eficácia na sua utilização [42]. Durante o desenvolvimento de formulações, leva-se em consideração o tipo de liberação da substância ativa, que podem ser de: pronta ou lenta liberação.

Os medicamentos de liberação convencional (pronta liberação) visam liberar o fármaco rapidamente após a administração. Caso seu uso seja frequente, observa-se a

presença de picos e vales no perfil da curva de concentração do princípio ativo na corrente sanguínea (Figura 3-3). Estes sistemas se utilizam de diluentes solúveis, desintegrantes e/ou outros recursos que favorecem a liberação e dissolução do princípio ativo [41].

Figura 3-3. Gráfico comparativo entre administração de fármacos pelo método tradicional e com liberação controlada



Fonte: De Lyra *et al.* [43]

De acordo com Huynh e Lee [44], os sistemas de liberação controlados são definidos como a entrega customizada de componentes (drogas, proteínas, fertilizantes, nutrientes e outros agentes ativos biológicos) em um nível efetivo em resposta ao tempo e estímulo (por exemplo, pH, temperatura, enzimas, luz UV, campos magnéticos, osmose).

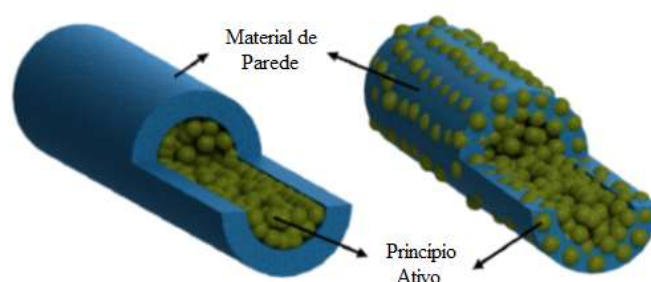
Desta forma, na área médico-farmacêutica, as formulações que se utilizam da liberação controlada, ou lenta, mantêm constantes as concentrações da droga no plasma em função do tempo depois da administração (Figura 3-3) [42]. Suas vantagens são: diminuição dos efeitos colaterais, já que a liberação ocorre no nível terapêutico; gastrorresistência; prolongamento do efeito farmacológico; liberação do fármaco em um sítio específico ou após um período definido de tempo; e administração menos frequente, diminuindo o custo diário para o usuário [41,42].

Dentre as classes de materiais, alguns polímeros são amplamente utilizados em suturas cirúrgicas, estruturas cartilaginosas, lentes de contato, seringas, membranas, sistemas de liberação controlada de fármacos e outras aplicações biomédicas [11–13].

Os polímeros podem ser componentes essenciais nos dispositivos de liberação controlada por exercerem ação direta na liberação dos fármacos, já que atuam como materiais de parede versáteis que podem incorporar ou adsorver ingredientes ativos

(Figura 3-4) e modificadores físicos e/ou químicos devido à sua diversidade de estruturas químicas [45]. Desempenham o papel de excipientes na formulação com a finalidade de estabilizar física, química e microbiologicamente o produto, melhorar a disponibilidade do princípio ativo no organismo, facilitar a adesão do paciente ao tratamento e promover segurança e efetividade da formulação [46].

Figura 3-4. Polímeros como materiais de parede promovendo encapsulação ou distribuição do princípio ativo na fibra



Fonte: Esfanjani e Jafari [47] (adaptado pelo autor)

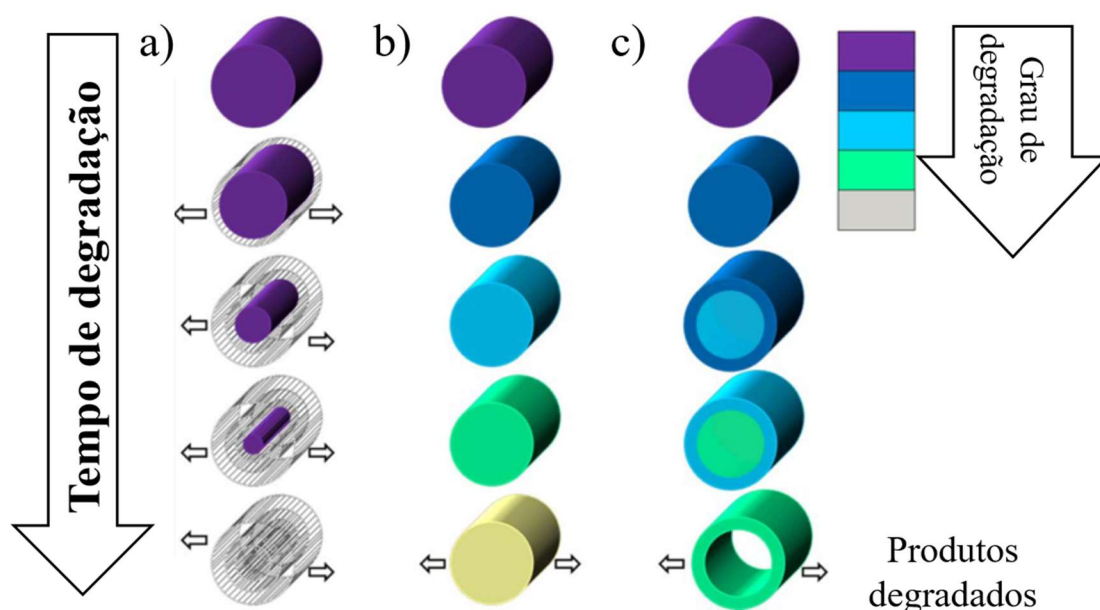
Como uma das chaves de seleção para a liberação controlada é o tipo de mecanismo de liberação, os polímeros são usados como “barreiras” químicas e/ou físicas para proporcionar a liberação gradual da dose medicamentosa no organismo [43]. Portanto, a avaliação dos processos de erosão e perda de carga darão o perfil de desprendimento do fármaco para o meio.

A degradação ou erosão da superfície (Figura 3-5a) é um processo físico de degradação que envolve a clivagem hidrolítica da cadeia polimérica, ou seja, é dependente da diluição e dissolução desta com o meio. Este processo ocorre porque a taxa de cisão das cadeias é maior do que a entrada de água na estrutura polimérica, afinando-a sem comprometer a massa molecular da carga interna do polímero e os produtos de degradação são oligômeros e monômeros. Sua vantagem é a predição do processo, pois as taxas de liberação são predeterminadas e de ordem de erosão zero, tornando-as altamente reprodutivas [48,49].

A degradação em massa (Figura 3-5b) é um processo químico que ocorre devido à penetração de água em todo o polímero, inclusive internamente, promovendo hidrólise, dissolução e difusão do medicamento e do polímero. Os produtos gerados durante a permeabilização são quebras hidrolíticas aleatórias com completa redução de massa molar do polímero e difusão dos oligômeros e monômeros de dentro da carga polimérica

para o meio. O desgaste ocorre gradualmente até equilibrar com a difusão da água no polímero. Caso este equilíbrio seja quebrado, pode promover degradação com autocatálise no interior da formulação (Figura 3-5c), acelerando a degradação interna em comparação com a superfície, ou seja, a casca mantém sua massa molar enquanto o interior perde [48,49].

Figura 3-5. Tipos de degradação dos polímeros biodegradáveis. (a) Erosão (b) Degradação em massa (c) Degradação em massa com autocatálise.



Fonte: Woodruff e Hutmacher [49] (adaptado pelo autor)

3.4 Fibras micro- e nanoestruturadas por *Solution Blow Spinning*

Materiais em escala micro- e nanométrica podem apresentar propriedades físicas e químicas diferenciadas devido à sua reatividade, pureza, cristalinidade e estrutura de superfície [50]. As micro- e nanoestruturas podem possuir diversos formatos, como partículas, fibras, *whiskers*, esponjas, vidros, filmes, tubos, flores etc. [49,51,52].

As fibras encapsulam sólidos, líquidos ou voláteis em finas camadas poliméricas que podem liberar seu conteúdo a taxas controladas e condições específicas, sendo classificadas de acordo com parâmetros morfológicos de tamanho e distribuição do ativo [45].

As nanofibras podem possuir diâmetros de até 100 nm em formatos de fitas, tubos, hastes ou poros. Estas estruturas são uma das mais desejadas na engenharia de tecidos por causa de sua baixa densidade, alto volume de poros, alta razão entre superfície e volume, superior encapsulamento de fármacos, estabilidade estrutural e arquitetura similar às matrizes extracelulares [15,16].

Os métodos de obtenção mais usados são a fiação por fusão (*melt spinning*), a fiação por sopro em fusão (*melt blowing spinning*), eletrofiação (*electrospinning*) e a fiação por sopro em solução (*Solution Blow Spinning* - SBS) [15,25,53]. Todos permitem a incorporação de fármacos, nanopartículas ou cromóforos semicondutores e catalíticos, enzimas, proteínas e micro-organismos dependendo de sua finalidade [15]. O conjunto de fibras obtidas por esses processos é nomeado de mantas ou véus não-tecidos porque o emaranhamento se utiliza das propriedades físicas e químicas do material para sua formação, enquanto as técnicas das fibras tecidas se baseiam no entrelaçamento transversal e longitudinal de fios [54].

O processo de fiação por fusão (*melt spinning*) envolve a extrusão do polímero fundido que vai sendo estirado e coletado por bobinas. Durante seu resfriamento, as cadeias vão se orientando e as fibras se tornam mais fortes [55]. Uma das limitações deste tipo de fiação é sua restrição a materiais viscoelásticos, que podem resistir às tensões durante o processo de estiramento [25].

A técnica de fiação por sopro em fusão (*melt blowing spinning*) se baseia na extrusão de polímeros no estado fundido através de pequenos orifícios em fluxos convergentes de ar quente que rapidamente atenuam o extrudado em fibras de pequeno diâmetro [56].

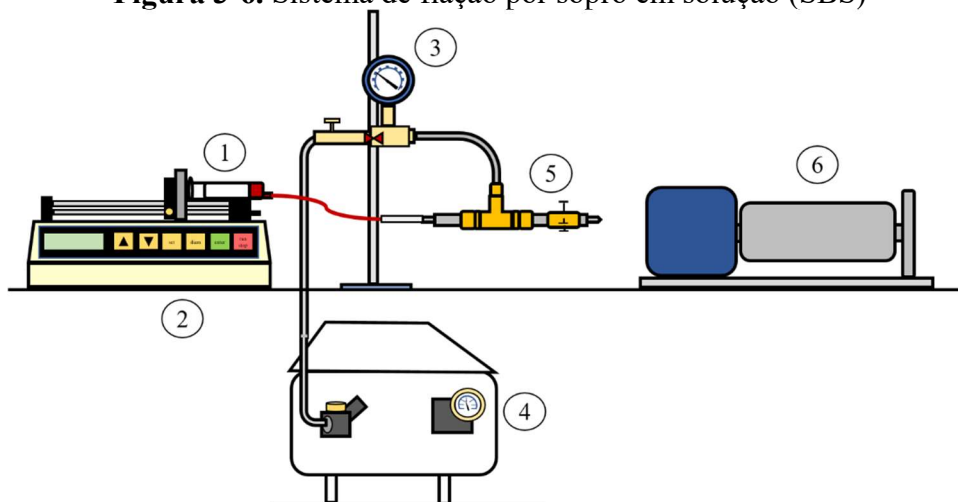
O método de eletrofiação se utiliza de uma diferença de potencial que é aplicada na solução polimérica, que é alimentada por uma seringa, para superar sua tensão superficial, liberando através do bico um jato deste líquido para o coletor, evaporando o solvente neste percurso, resultando nas fibras [15,25].

Em 2009, Medeiros *et al.* [25] desenvolveram um sistema para a produção de nanofibras, que consiste dos elementos da eletrofiação e da fiação em sopro, denominado como “fiação por sopro em solução” (*Solution Blow Spinning* – SBS). Este conjunto compete com a eletrofiação com as vantagens de não precisar de equipamentos de alta voltagem, poder utilizar solventes de quaisquer constantes dielétricas, ser mais produtiva pela velocidade de fiação e volume de fibras devido ao aumento da taxa de injeção da

solução polimérica [25]. O princípio que governa a síntese são as forças arraste aerodinâmicas para formação das fibras.

O sistema do SBS é composto (Figura 3-6) por seringa (1), bomba injetora (2), manômetro (3), compressor de ar (4) ou cilindro de gás, bicos concêntricos (5), coletor (6) e distância de trabalho entre o sistema de bicos e o coletor.

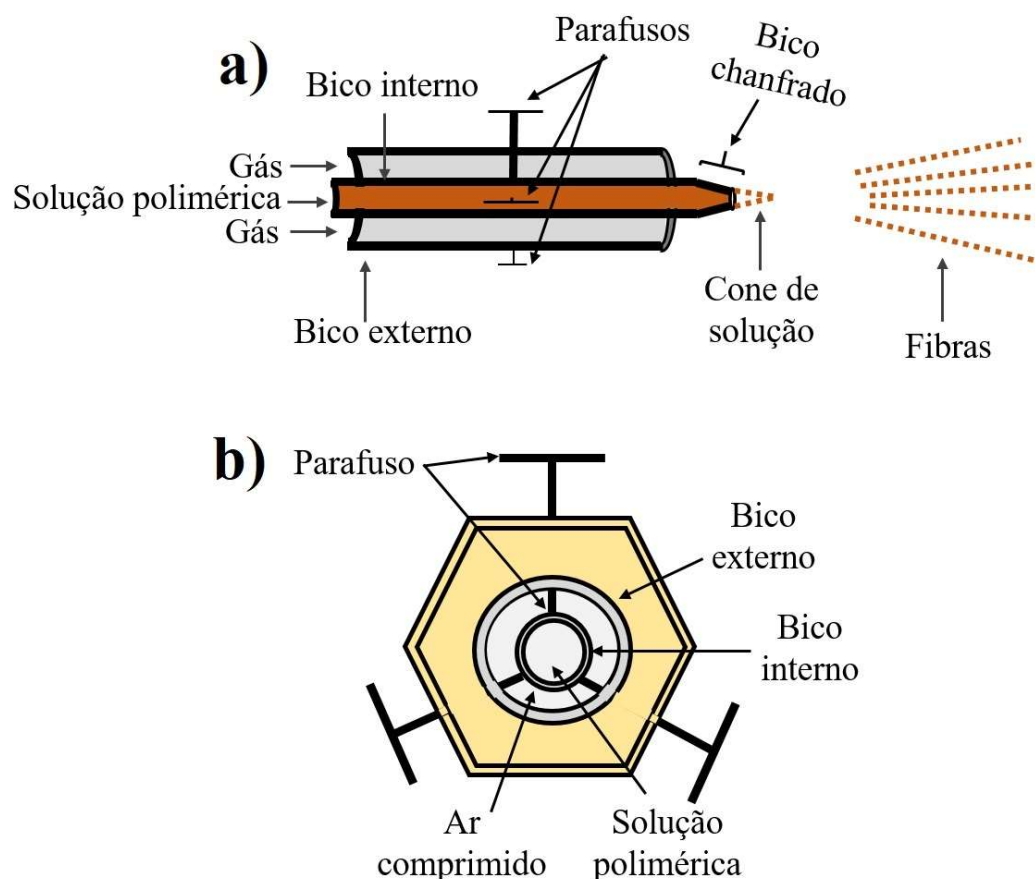
Figura 3-6. Sistema de fiação por sopro em solução (SBS)



Legenda: 1. Seringa. 2. Bomba injetora. 3. Manômetro. 4. Compressor de ar. 5. Bicos concêntricos. 6. Coletor. Fonte: Próprio autor

O SBS se utiliza de bicos concêntricos (Figura 3-7a) pelo qual a solução polimérica é ejetada pelo bico interno a uma taxa constante, formando uma gota (cone de solução) que é estirada por uma corrente de gás (ar, nitrogênio, argônio, etc.) a uma pressão definida proveniente do bico externo do sistema, até o coletor. O chanfro no bico interno aumenta o contato entre o ar e a solução polimérica, melhorando seu estiramento. Enquanto o jato percorre a distância de trabalho, o solvente evapora e a fibra polimérica é coletada por uma bobina ou diretamente no organismo vivo, como por exemplo na pele humana [57,58]. A Figura 3-7b mostra sua visão frontal, em que se realiza o ajuste entre os três parafusos para que o bico interno se centralize ao máximo com o externo.

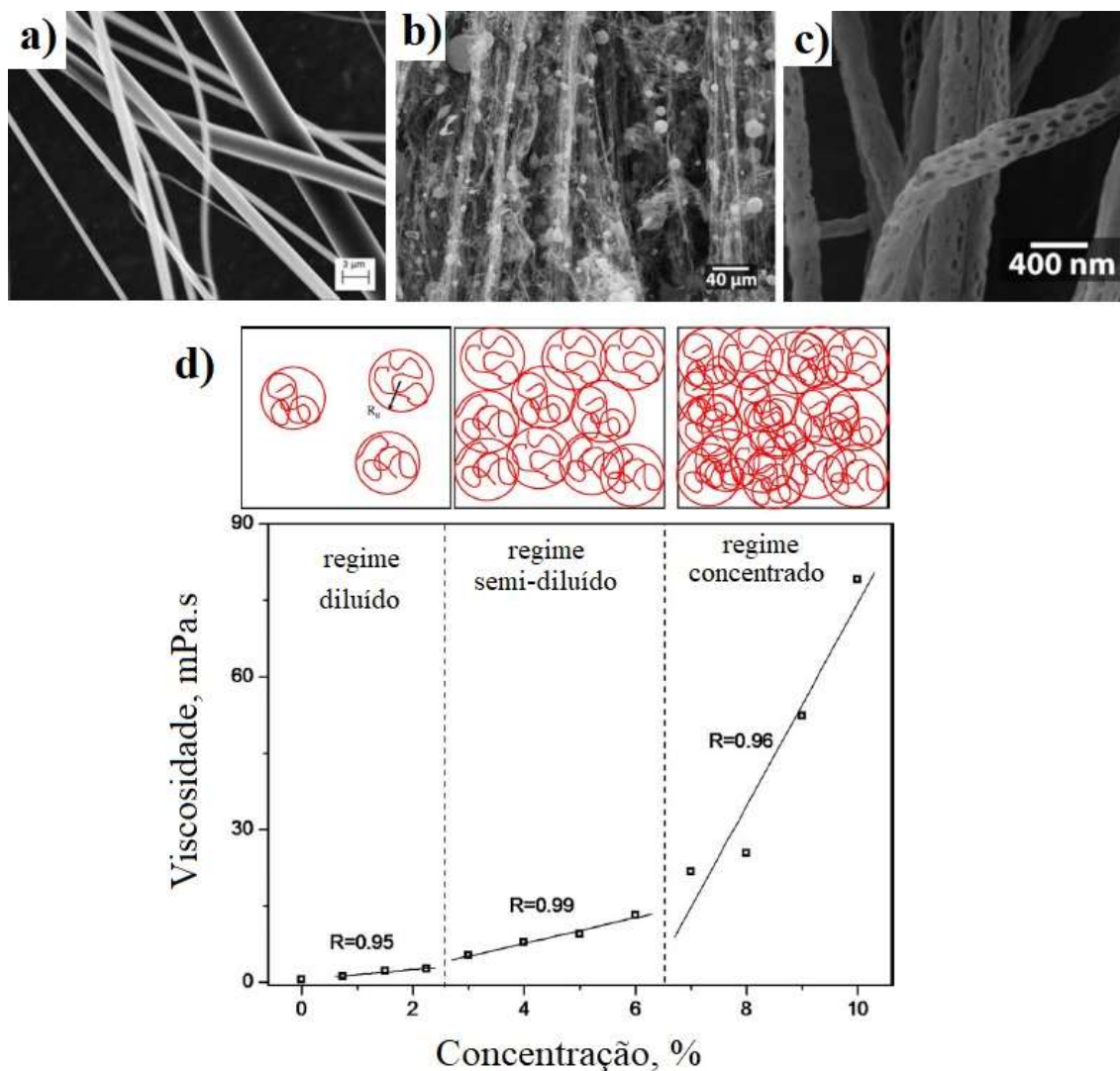
Os parâmetros que influenciam a morfologia das fibras podem ser divididas em: variáveis de solução, como interação polímero-solvente, concentração do polímero, viscosidade, tensão superficial, taxa de evaporação; e variáveis do processo, como taxa de injeção, pressão, distância de trabalho, atmosfera usada, velocidade e tipo de coletor [53,59].

Figura 3-7. Sistema de bicos concêntricos do SBS

Fonte: Próprio autor

Quanto as variáveis de solução, a viscosidade está diretamente associada à sua concentração, tendo para soluções concentradas, o aumento do diâmetro das fibras (Figura 3-8a) devido à concentração estar no regime concentrado em que há elevado emaranhamento entre as cadeias poliméricas (Figura 3-8d); e para soluções menos concentradas, obtém-se morfologias com contas, corpusculares ou *beads* (Figura 3-8b) [53,60], referente ao regime semi-diluído em que as cadeias poliméricas estão parcialmente emaranhadas (Figura 3-8d). Filmes acontecem quando a evaporação do solvente não é completa [61], geralmente acontece no regime diluído por as cadeias poliméricas estarem afastadas umas das outras (Figura 3-8d). Fibras porosas (Figura 3-8c) são possíveis utilizando diferentes atmosferas [62], níveis de umidade ou temperatura [63].

Figura 3-8. Possíveis morfologias de fibras (a) lisas, (b) com *beads*, (c) porosas e (d) tipos de regime em soluções poliméricas



Fonte: Bonan *et al.* [64], Gupta *et al.* [65], Medeiros *et al.* [62] e Oliveira *et al.* [57] (adaptado pelo autor)

Oliveira e colaboradores [66], em seus estudos sobre os parâmetros de variação do PDLLA, observaram que o aumento da viscosidade favorece a formação de fibras emaranhadas e ramificadas. Oliveira *et al.* [67], ainda com PDLLA, avaliou o efeito do solvente nas fibras, concluindo que a mudança de solvente e concentração pode gerar propriedades únicas de processamento e morfologia, uma vez que a interação polímero-solvente muda a miscibilidade, viscosidade, taxa de evaporação e até cristalinidade devido ao emaranhamento ineficiente do polímero por causa de sua concentração levando a formação de *beads*.

A taxa de injeção do polímero pode ser responsável pela elevação do diâmetro das fibras e sua distribuição. Este parâmetro no valor ideal promove a formação de um cone

estável de solução na saída do bico interno em associação com a pressão de gás e distância de protusão entre os bicos (área anelar de vazão de gás). O uso de taxas mais altas pode promover a solidificação do polímero no bico interno, ocorrendo entupimento ou, em taxas baixas, desestabilizar o jato da solução polimérica [57].

A pressão do sistema de gás, a distância de trabalho, o diâmetro e a geometria dos bicos concêntricos (área anelar de vazão do ar), distância de protusão são variáveis que promovem o regime e velocidade do fluxo do gás, influenciando na evaporação do solvente, dispersão dos diâmetros e morfologia das fibras. A evaporação incompleta do solvente antes de alcançar o coletor, além de poder diminuir o poder de estiramento das fibras, pode fazer com que haja a formação de filmes contínuos ou regiões não fibrosas, ao invés de mantas não-tecidas [68].

Em relação às variáveis do coletor, como geometria, velocidade e regime de movimentação sua influência pode modificar propriedades macro- e microscópicas em termos de forma, orientação e pontos de amarração responsáveis por características como permeabilidade, estabilidade dimensional e propriedades mecânicas [69].

A adição de fármacos também pode alterar a morfologia das fibras, dependendo da interação fármaco-polímero-solvente, fazendo com que a droga se cristalize sobre as fibras formando agulhas, haja a formação de *beads* ou filmes, mesmo mantendo-se constante as condições de fiação sem o princípio ativo [70].

3.5 Nanofibras no tratamento de feridas

As nanofibras têm mostrado arquitetura adequada no desenvolvimento de aparatos modernos para biomedicina podendo substituir temporária ou definitivamente cartilagens, ligamentos, cordas vocais, tecidos cardíacos, respiratórios e cutâneos [71,72].

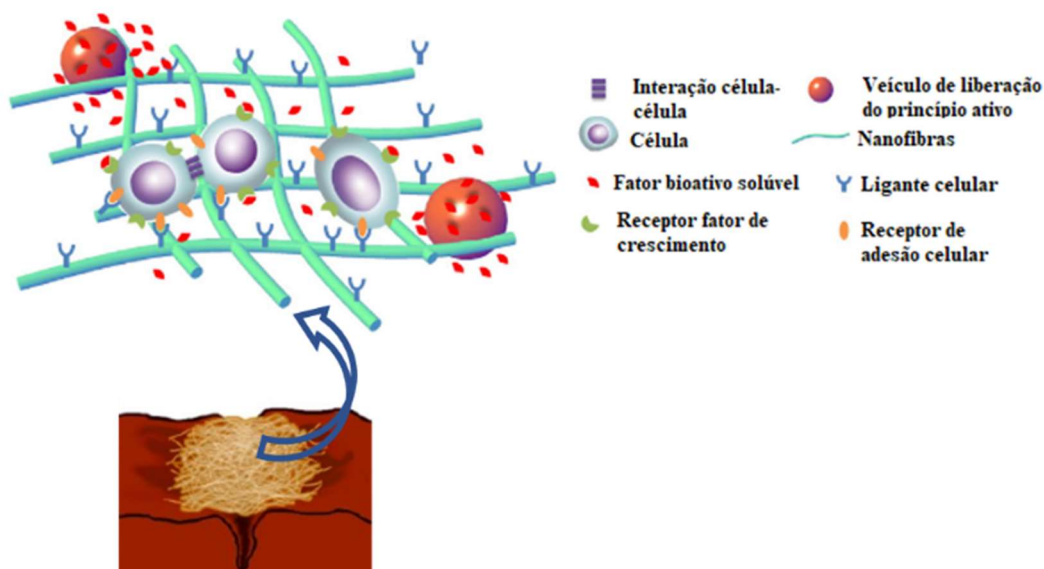
Para a área de tratamento de feridas, as nanofibras tem se mostrado uma estrutura interessante por dependendo de sua molhabilidade promover um ambiente úmido e protegido contra perigos mecânicos e contaminação microbiológica; pode se ajustar ao formato da ferida, absorver o fluido da lesão contendo a proliferação bacteriana, estimular homeostase, sem vazar o exsudato. Pode também eliminar a dor, excitar a re-epitelização durante a fase reparativa, ser facilmente aplicada e removida com mínimo de prejuízo para o tecido íntegro adjacente [12,24,29,31].

Essas características são possíveis devido aos seus diâmetros variarem de nanômetros à micrômetros [72], fazendo com que sua estrutura fibrosa sirva de suporte

para o crescimento da matriz extracelular natural, que é composta por uma rede de fibras de colágeno com 50 a 500 nm de diâmetro [17], mimetizando espécies biológicas do organismo e atuando seletivamente no reconhecimento biomolecular em um microambiente [71].

A possibilidade de se ter alta área superficial, elevada porosidade e interconectividade espacial entre as fibras favorece a adesão celular, proliferação, diferenciação e migração em cada etapa de cicatrização de feridas, cuja eficácia pode aumentar devido à incorporação de princípios ativos (Figura 3-9). Estas características são as que também promovem transporte de nutrientes, oxigênio, fatores de crescimento e comunicação celular e eliminação de resíduos, assegurando a hidratação no processo cicatricial [73–75].

Figura 3-9. Biomimetização das nanofibras acomodando células para formação de tecido



Fonte: Behrens *et al.* [76] e Zhang *et al.* [17] (adaptado pelo autor)

As mantas não somente mimetizam a estrutura fibrosa do tecido cutâneo em regeneração, como também podem ter suas propriedades mecânicas similares às da pele [24]. A pele humana possui módulo de Young, resistência à tração e alongação de 2,9 a 150 MPa, 1 a 32 MPa e 17 a 207%, respectivamente [77–79]. Na mesma sequência, para as fibras de PCL com colágeno e hidroxiapatita com poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) se tem 21,4 a 82,1 MPa, 1,52 a 8,6 MPa e 24,0 a 116% [80–82].

Os processos de fiação são aplicáveis à uma grande variedade de materiais para conferir às nanofibras uma composição que atinja as propriedades e funcionalidades

requeridas, oferecendo flexibilidade na funcionalização de superfícies [75]. Estas propriedades marcantes fazem com que os polímeros sejam bons candidatos para esta aplicação devido à sua estrutura e tamanho molecular serem similares às proteínas, possibilidade de diferentes polaridades e origem [72,73].

Contudo, um dos gargalos em relação aos polímeros é o equilíbrio da polaridade. Uma vez que a hidrofilicidade é um dos requisitos para que o curativo possa promover homeostase, absorver o exsudato, não deixá-lo vasar e promover crescimento celular devido ao seu reconhecimento biológico. Por outro lado, as fibras provenientes de polímeros mais hidrofílicos acabam sendo menos resistentes e mais difíceis de serem processadas. Para os polímeros hidrofóbicos, estas características são opostas [24,73,74].

Portanto, para que esta limitação seja superada, tem sido desejável o uso de blendas entre polímeros polares e apolares para equilibrar e melhorar as condições de permeabilidade (hidratação da ferida, sua homeostase e absorção de exudato), assim como moldar o dispositivo ao ferimento, evitar formação de cicatriz e também sua biodegradação e bioabsorção, que são propriedades interessantes na reparação de tecidos para que os polímeros desapareçam ou sejam consumidos enquanto a regeneração vai ocorrendo [24,73,74].

Para confirmar a ação das nanofibras em termos de fechamento de feridas, Kim *et al.* (2014) [83] desenvolveram nanofibras de poliuretano incorporadas com própolis em que se observa a inibição bacteriana de *Escherichia coli*, assim como o crescimento significativo de fibroblastos 3T3-L1 em 7 dias, principalmente para a manta com propolis. A manta controle (somente poliuretano) também promoveu adesão celular em suas estruturas.

Perumal *et al.* (2017) [84] estudaram feridas artificiais em fibroblastos 3T3 de ratos Swiss tratando-as com nanofibras de PLA com curcumina. Os resultados revelaram que estas tiveram pouca migração celular na área lesionada, enquanto as mantas de PLA com poliglicerol hiperramificado e curcumina tiveram 100% de fechamento. Acredita-se que esta condição favorece a ligação e taxa de crescimento celular devido ao aumento da hidrofilicidade da blenda que pode ter promovido rápido inchamento do dispositivo.

Wang *et al.* (2018) [74] utilizaram queratinócitos humanos em placas Transwell® com 12 poços para simular lesões cutâneas. Os resultados mostram que as fibras com blenda de PCL e quitosana com dexpanthenol tiveram diminuição na área de ferimento em 59% em 120 h, enquanto o controle (salina) teve fechamento de 37% e as fibras sem fármaco, 27%, cujo resultado sugere que nanofibras de PCL/quitosana não exercem

suporte proliferativo e migratório de células, apesar de sua atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Logo, as nanofibras têm o potencial para o desenvolvimento de dispositivos transdérmicos voltados para cicatrização de feridas devido às suas propriedades [12,24,29,31]. A utilização dos polímeros, como o PLA e o PEG, incorporados com substâncias bioativas, tal como a própolis vermelha, são interessantes para se controlar sua liberação através de diferentes mecanismos de degradação. Isto é possível por causa da alteração de molhabilidade entre diferentes proporções de polímeros quando um deles é hidrofóbico e o outro hidrofílico, como neste caso.

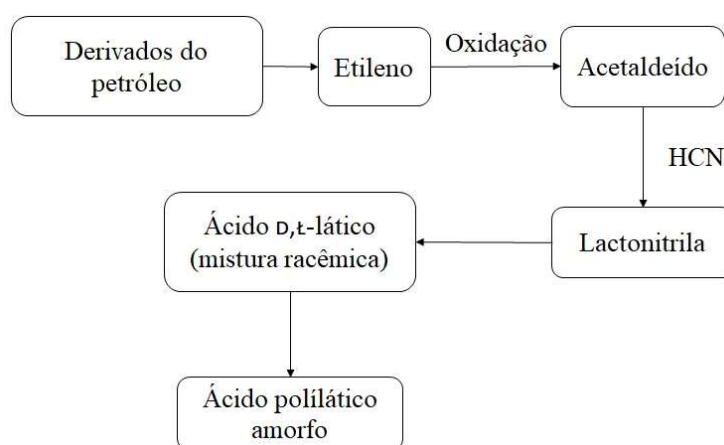
3.6 Poli(ácido láctico) - PLA

Comercialmente conhecido como ácido polilático, o poli(ácido láctico) (PLA) ou ácido poli(2-hidroxipropanóico) $-(C_3H_6O_3)-$, é um polímero alifático, semicristalino, biocompatível, biodegradável. Possui formas isoméricas quirais, baixa toxicidade, moderada tensão mecânica e plasticidade térmica e é compostável [85,86]. O PLA é relativamente duro (dependendo de sua massa molar (M_n) e cristalinidade), possui transição vítrea entre 60 a 70 °C; temperatura de fusão entre 170 a 180 °C; temperatura de decomposição entre 227 e 255 °C. É solúvel em clorofórmio, acetona, furano, dioxano, dioxolano, tetrahidrofurano, diclorometano, dimetilcarbonato, dimetilformamida [87]. Parcialmente solúvel em xileno, dimetilsulfóxido, etil lactato e etil acetato. É insolúvel em água, metanol, etanol, hexano e heptano [88,89].

O ácido láctico é encontrado na natureza em músculos mamários durante a glicogenólisis e está envolvido no ciclo de Krebs (uma das fases da respiração celular) através do ácido pirúvico e acetilCoA ou através da fermentação do amido ou da dextrose. Devido a sua ampla biocompatibilidade com o corpo humano, o PLA é amplamente utilizado na área biomédica, como em implantes, suturas e dispositivos médicos. Também vem sendo aplicado na plasticultura, artigos descartáveis de luxo para festas, potes plásticos para armazenar alimentos, em filmes para biorremediação e fibras têxteis. O PLA é reconhecido como um material seguro pela Administração de Alimentos e Fármacos (*Food and Drug Administration (FDA)*, em inglês) dos Estados Unidos [90]. Pode ser produzida comercialmente através de derivados de petróleo ou fermentação [91,92].

A obtenção de ácido láctico (Figura 3-10) através dos derivados de petróleo envolvem seu refino à etileno, que é oxidado para se obter acetaldeído, que por sua vez passa por uma reação de adição com HCN, formando a lactonitrila, que com auxílio de um catalisador metálico, se obtém a mistura racêmica do ácido láctico [91]. Porém, o alto custo do precursor do ácido láctico, que é um derivado de petróleo, e a impossibilidade de se produzir o L-lactato restringiram o desenvolvimento em outras aplicações que não as biomédicas. A viabilidade do PLA em escala comercial para fins não-médicos se tornou possível quando o ácido láctico começou a ser produzido por fermentação bacteriana do amido devido ao seu baixo custo [85,90].

Figura 3-10. Produção do ácido láctico através de refino de petróleo



Fonte: Gupta, Revagade, Hilborn [91] (adaptado pelo autor)

Desta forma, o ácido láctico vem sendo obtido via fermentação do amido de milho com cepas de *Lactobacillus*, tais como *Lactobacillus delbrueckii*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus* and *L. leichmannii*, ou *Streptococcus equinus* [93]. Estas bactérias são mantidas em pH entre 5,4 e 6,4, temperatura de 38 a 42 °C, baixa concentração de oxigênio, nutridas com glucose e maltose proveniente de milho, batata ou de outros recursos, como vitamina B, aminoácidos e nucleotídeos de licor de alta concentração de milho [90,91].

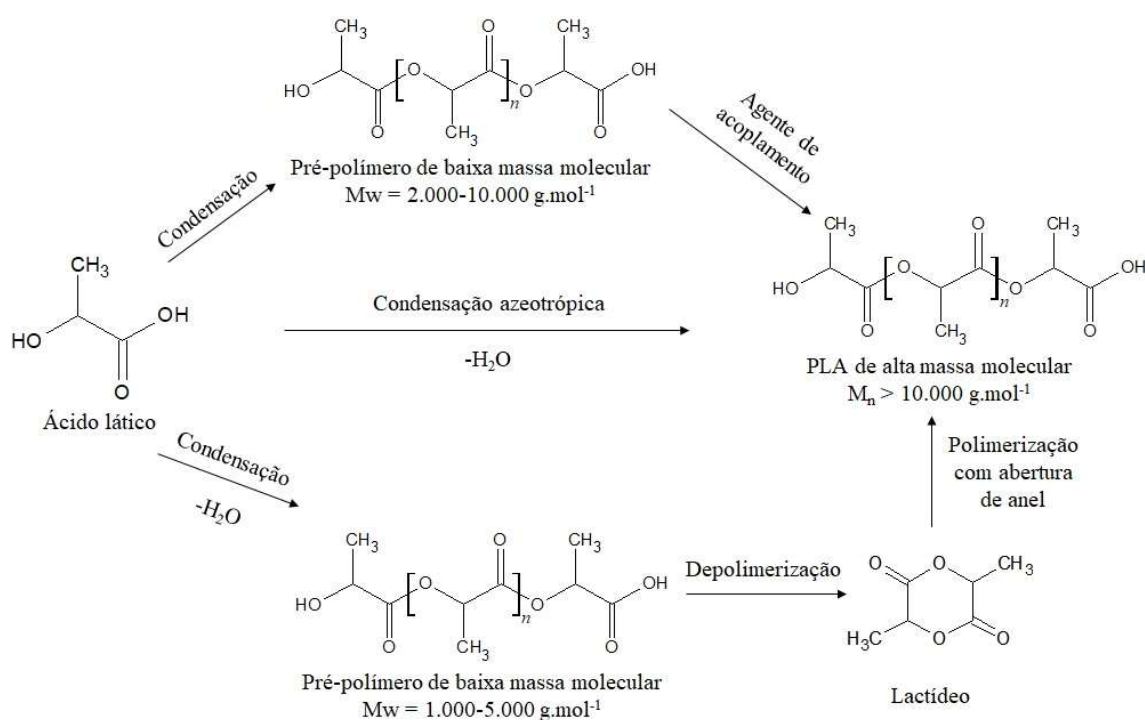
A polimerização do ácido láctico à PLA de elevada M_n pode ser feita por condensação direta em solução azeotrópica ou através da ruptura do anel [90] (Figura 3-11).

A condensação direta (Figura 3-11) envolve três etapas principais: remoção de água livre sob elevadas temperaturas e pressões; policondensação oligomérica e policondensação por fusão de PLA de altas M_n . Este processo é geralmente considerado

o processo mais barato para se obter PLA de baixas M_n , apesar de se usar agentes de acoplamento e adjuvantes para se obter PLA de altas M_n , deixando o processo mais caro e complexo [90,91,94].

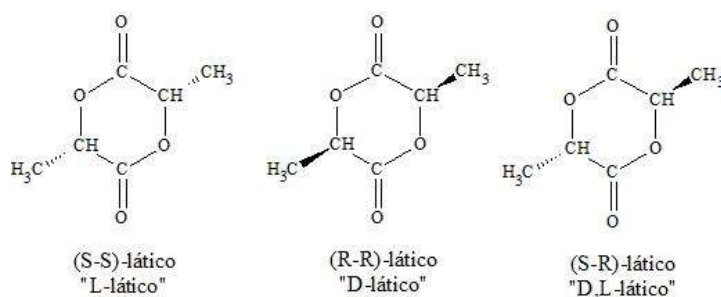
A policondensação direta em solução azeotrópica (Figura 3-11) é isenta de adjuvantes e extensores de cadeia, já que o PLA é condensado diretamente, enquanto a água residual é removida por destilação azeotrópica. Adiciona-se difenil éster e catalisador. Filtra-se a solução em peneira de 3-Å e purificado [90,95].

Figura 3-11. Síntese do PLA



Fonte: Gupta, Revagade, Hilborn [91] (adaptado pelo autor)

Figura 3-12. Estruturas quirais do ácido láctico



Fonte: Castro-Aguirre *et al.* [90] (adaptado pelo autor)

A polimerização do ácido láctico à PLA através da formação do lactídeo (Figura 3-12) combina um processo livre de solventes e uso de destilação. Inicialmente, o ácido láctico é condensado para formar o pré-polímero de PLA de baixa M_n . Controlando-se a despolimerização, obtém-se o ciclolactídeo, um dímero cíclico, que é purificado por destilação e o PLA é formado com M_n controlada pela ruptura do anel do lactídeo, seguido da polimerização com catalisador [90,96,97].

O PLA produzido pela ruptura de anel (Figura 3-11) pode se apresentar nas isomerias levógera (L), dextrógera (D) ou racêmica, sendo representados pelos D,D-lactato (D -lactato), L,L-lactato (L -lactato) e D,L-lactato (ou meso-lactato), respectivamente (Figura 3-12). A polimerização desses lactatos leva a formação de estruturas primárias de PLA isotática (altamente cristalino), sindiotática e atática/heteroatática (amorfo). Tanto PLLA quanto o PDLA podem possuir, no mínimo, três formas polimórficas (α , β e γ) por ambos serem semicristalinos [98].

A degradação do PLA ocorre principalmente através da quebra das cadeias principais ou laterais, como acontece em muitos polímeros. Na natureza, a degradação polimérica pode ser induzida pela ativação térmica, hidrolítica, biológica, oxidativa, fotólise ou radiólise. Os fatores ambientais não só influenciam a degradação do polímero, eles também têm influência crucial na população de micro-organismos. Parâmetros como umidade, temperatura, pH, salinidade, presença ou ausência de oxigênio e suprimento de diferentes nutrientes têm efeitos importantes na degradação microbiana dos polímeros e essas condições devem ser consideradas quando a biodegradação do plástico é testada. Esse processo também é dependente das características físicas e químicas do polímero, tais como difusividade, porosidade, propriedades mecânicas, morfologia, parâmetro de rede, pureza, reatividade química, tolerância térmica e resistência à radiação eletromagnética [88].

O PLA vem sendo considerado um polímero multifacetado do ponto de vista ecológico porque em seu ciclo de vida ele poder ser reutilizado, reciclado, ser usado em compostagem, queimado podendo sua energia de combustão ser aproveitada ou aterrado. Logo, conclui-se que se trata de um polímero sustentável por sua produção ser proveniente de matérias primas renováveis, pode ser reprocessado e seu fim de vida ter utilização prática como sugere a Agência Americana de Proteção Ambiental (*US Environmental Protection Agency (EPA)*, em inglês) [85,90].

3.7 Polietilenoglicol (PEG)

O polietilenoglicol (PEG), poli(óxido de etileno) ou 1,2-etanodiol é um polímero termoplástico semi-cristalino. É um poliéter sem carga, de fórmula química $(C_2H_4O)_n$, sendo uma das estruturas mais simples de polímeros solúveis em água. É comercialmente disponível em diferentes M_n , que variam de 200 g.mol⁻¹ a milhões. Os membros de baixa M_n (até 100.000 g.mol⁻¹) são chamados de polietilenos glicóis (PEG) e os de $M_n > 100.000$ g.mol⁻¹, de poli(óxidos de etileno), polioxietileno ou PEO [99].

As propriedades físicas do PEG variam de líquido viscoso a sólido ceroso de acordo com sua M_n ; são consideradas bioresistentes com $M_n > 1000$ g.mol⁻¹ e abaixo disso, são biodegradáveis [100]. O ponto de fusão pode variar de 4 °C a 60 °C de acordo com a M_n , assim como sua viscosidade [99,101]. Sua cristalinidade aumenta com o aumento de sua M_n devido a diminuição de mobilidade e alinhamento geométrico mais conveniente com elevação da massa [101]. São solúveis em água, para todas as M_n . Também são solúveis em metanol, etanol, tolueno, clorofórmio, dimetilsulfóxido, tetrahydrofurano, entre outros solventes orgânicos [102]. É insolúvel em éter de petróleo, hexano, etileno glicol e óleos [103].

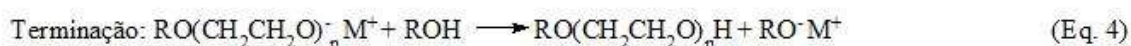
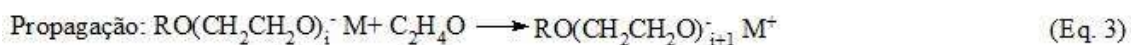
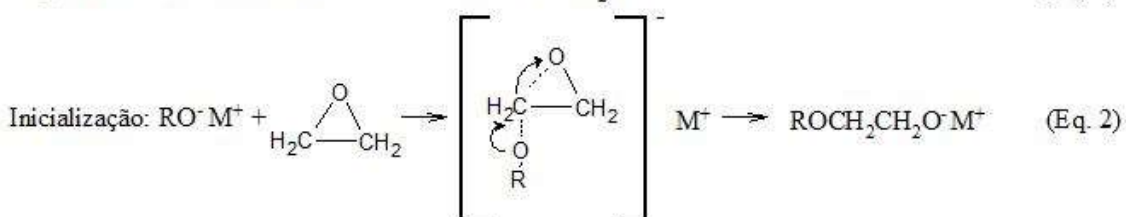
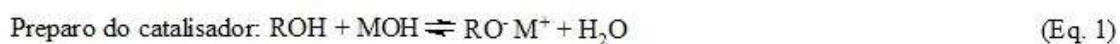
Estudos sobre PEG em solução revelam que cada mero de etileno glicol pode estar fortemente ligado a duas ou três moléculas de água, o que torna esse polímero amplamente utilizado na indústria farmacêutica para realização da PEGilação, que consiste na ligação covalente do PEG com uma proteína, peptídeo, oligonucleotídeo ou fragmentos de anticorpo, melhorando em até 10 vezes a solubilidade de proteínas isoladas em meio aquoso [104,105].

O PEG é fabricado em largas quantidades e usada como “*commodities*” químicos em várias áreas industriais, sendo majoritariamente aplicado como surfactante não-iônico em detergentes domésticos e industriais e emulsificante de alimentos. Devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixa irritação quando em contato com a pele, foi aprovado pela FDA, sendo usado na indústria farmacêutica na preparação de pomadas, supositórios [106], tabletes e solventes para injeção, assim como em cremes, loções, pós, bases e batons. São também encontrados como intermediários de preparação de resinas (como as alquídicas e poliuretanas), componentes na fabricação de lubrificantes, anticongelantes, agentes molhantes, anti-incrustantes [107], suavizantes e osmóticos [108], tintas de impressoras, adesivos, produtos para engraxar sapatos e plastificantes. Na

área da biologia, é usado em resinas gelatinosas para modificação química de enzimas e imobilizar enzimas e células [99,100].

O PEG é obtido pela reação de etoxilação (Figura 3-13), que ocorre entre o óxido de etileno e água, álcoois (ROH) ou amidas (RNH₂ ou R₂NH) na presença de um catalisador, que pode ser um ácido ou uma base fortes [109]. A produção do PEG em meio básico, a mais utilizada na indústria, consiste na mistura do catalisador MOH, em que M geralmente é um metal alcalino (Na ou K), com água ou etanol para formação da base conjugada (Equação 1). A base conjugada (RO⁻), por sua vez, promove a abertura do anel do epóxido através de um ataque nucleofílico para se iniciar o processo de polimerização. Em seguida, tem-se a propagação das cadeias, em que o radical aniônico do epóxido reage com outra molécula de óxido de etileno, adicionando à sua estrutura mais um mero. Por fim, o crescimento das cadeias poliméricas finaliza, havendo recuperação do catalisador e obtenção do PEG [109].

Figura 3-13. Síntese do PEG



Fonte: Martins e Cardoso [109] (adaptado pelo autor)

3.8 Própolis

Nos últimos tempos, o uso de suplementos alimentares e medicamentos alternativos provenientes de recursos naturais vem crescendo de forma extraordinária. Muitos desses produtos vêm sendo estudados cientificamente com a finalidade de ratificar seu uso de forma segura e eficaz, já que são usados na medicina popular por séculos e seu uso pela população mundial chega a 80% atualmente [110,111].

Neste contexto, a própolis, também conhecido como “bee glue” (cola de abelha), vem sendo utilizado pelos humanos desde os tempos antigos. No Egito, 300 a. C., ela

tinha a finalidade de proteger os corpos mumificados da putrefação. Também foi usado pelos médicos gregos e romanos como antisséptico bucal e cicatrizante em lesões cutâneas. Os incas empregavam-na como agente antipirético. As farmacopeias inglesas do século XXVII o listou como fármaco oficial. Até hoje ela é aplicada na medicina popular de forma pura ou combinada com outros produtos naturais [112–115].

A própolis é um material resinoso coletado do exsudato (seiva) de plantas pelas mandíbulas das abelhas através de furos no caule, sendo este material manipulado por suas patas, enriquecido com sua saliva e secreções enzimáticas e levado à colmeia com a finalidade de proteger seu ambiente de contaminação microbiana, assim como para preencher buracos e defeitos nas paredes de sua casa e embalsamar insetos invasores mortos. Logo, todas essas atribuições refletem o significado desta palavra que é “proteção da colmeia” no grego, uma vez que *pro* que significa “proteção” e *polis*, cidade [112,115,116].

A própolis é quebradiça em baixas temperaturas, pegajosa em temperatura ambiente; possui propriedades adesivas; aroma balsâmico ou resinoso, picante ou forte; e pode ser amarela, parda, verde, marrom ou vermelha [117]. Em geral, a própolis *in natura* é composta por 30% de cera, 50% de resina e bálsamo vegetal, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e outras substâncias [112]. Sua composição química é determinada de acordo com as características fitogeográficas ao redor da colmeia [118], estação do ano [119,120] e por diferentes espécies de abelha [121,122]. Esta ampla atividade biológica do própolis é devido à presença de mais de 300 componentes, dentre eles se tem vários tipos de polifenóis, flavonoides, ácidos, ésteres, aldeídos fenólicos, cetonas, terpenos, esteróis, vitaminas, aminoácidos, entre outros [123].

Devido à sua extensão territorial, o Brasil possui grande diversidade de vegetal e climática, proporcionando 13 tipos diferentes de própolis [122]. Park *et al.* [124] classificaram em seu trabalho 12 tipos de própolis brasileiras, sendo 6 tipos na região sul, 5 tipos no nordeste e 1 tipo no sudeste e centro-oeste, cujas composições químicas se assemelhavam com a origem botânica e fenológica das plantas em torno da colmeia. Exemplo disto é descrito por Alencar *et al.* [125] que associaram o perfil químico da própolis verde de Minas Gerais e São Paulo com a resina vegetal do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*).

Em 2006, Trusheva *et al.* [126] catalogaram o 13º tipo de própolis no Brasil que ficou conhecida como a “própolis vermelha de Alagoas” devido à sua cor rubra (Figura 3-14a). Sua composição química foi associada por Dausch *et al.* [127] ao exsudato

(Figura 3-14b) coletado pelas abelhas *Apis mellifera* na planta chamada de rabo-de-bugio (*Dalbergia ecastophyllum*) (Figura 3-14c), que é predominante em manguezais e seu gênero pode ser encontrado na América do Sul e Central, África, Madagascar e Ásia [128,129]. Inicialmente, no Brasil, a própolis vermelha fora encontrada no litoral de Alagoas, contudo em todo litoral nordestino nas regiões de mangue pode constatar sua presença [19,130].

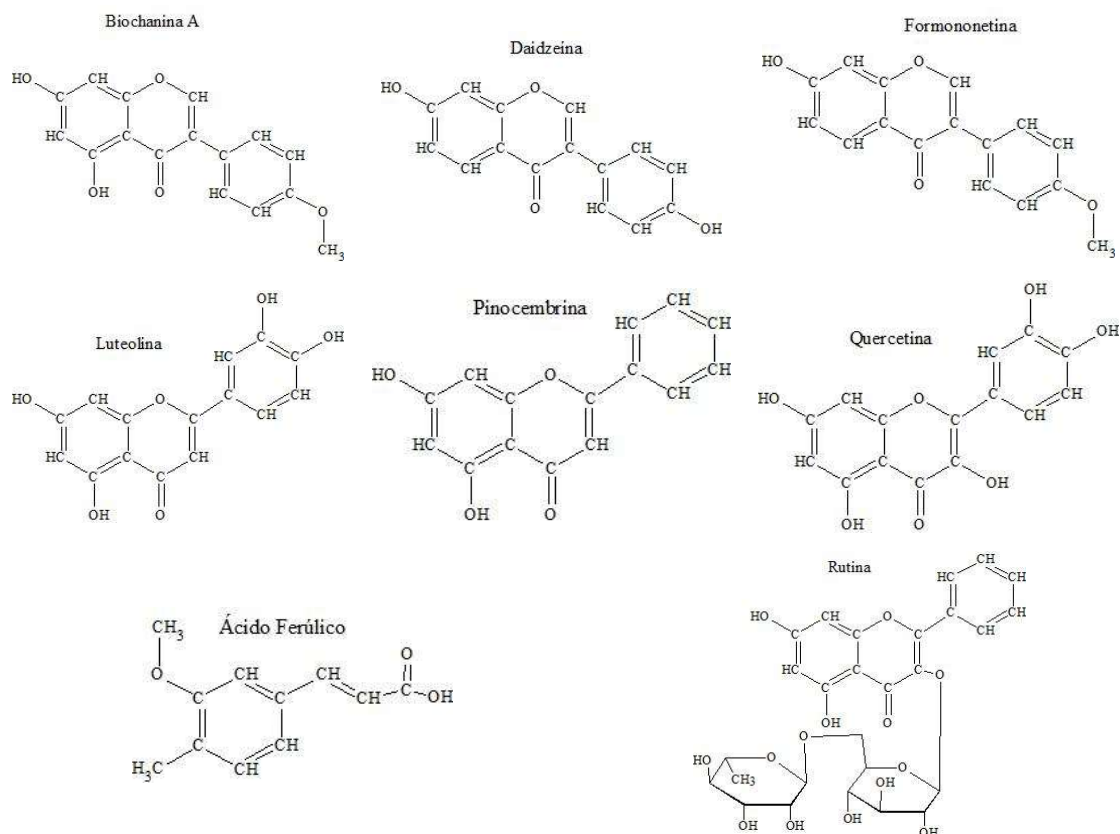
Figura 3-14. a) Própolis vermelha. b) Exsudato do caule da planta c) rabo-de-bugio



Fotografia: Edivaldo Ferreira Pacheco Filho

De acordo com Alencar *et al.* [131], Cabral *et al.* [132] e Neves *et al.* [19], os componentes majoritários da própolis vermelha são as isoflavonas biochanina A, daidzeína e formononetina; as flavonas luteolina, pinocembrina, rutina e quercetina; e o ácido ferúlico, que é um ácido carboxílico (Figura 3-15). Esses flavonoides têm sido reportados como as responsáveis pelas atividades anti-microbianas [19,133], anti-inflamatórias [134–137], antitumorais [138,139], antidiabéticas [140,141], antiviral [142,143], antioxidantes [136,144,145].

Flavonoides são moléculas polifenólicas caracterizadas pela presença de três anéis aromáticos. Há cerca de 4.000 flavonoides identificados, cujas diferenças estão no nível de oxidação e na substituição de grupos funcionais em diferentes posições no anel. Portanto, são classificados como flavonóis, flavonas, flavan-3-óis, antocianidinas, taninos condensados e isoflavonóides. Essas moléculas de pequena massa molar, são potentes antioxidantes e sequestradores de radicais livres [146]. São naturalmente encontrados em flores, folhas, sementes e caule de plantas, cuja principal função é protegê-los dos raios ultravioletas, da oxidação celular, dos predadores e patógenos, controlar o transporte de auxinas e atrair polinizadores através de suas cores [147,148].

Figura 3-15. Principais antioxidantes presentes na própolis vermelha

Fonte: Alencar *et al.* [20], Cabral *et al.* [132], Das Neves *et al.* [19] (adaptado pelo autor)

Este produto natural possui atividades que inibem o crescimento bacteriano em maior proporção em bactérias gram-positivas do que gram-negativas e também o crescimento fitopatogênico de fungos. São ativas em micoses superficiais, apresenta atividade antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, anticâncer, imunomodulatória e aumenta a imunidade. Logo, pode ser recomendado como antibiótico natural para algumas infecções fúngicas, epididimite, orquite, gonorréia, sífilis; antivirais como hepatite, dor na garganta; como bálsamo anti-inflamatório para casos de alergia, asma, rinite, artrite; anti-leishmaniose e anti-leucêmica [149].

No caso de regeneração tecidual cutâneo, acredita-se que a ação antioxidante dos flavonoides da própolis atue sequestrando os radicais livres produzidos pelos neutrófilos e inibindo a síntese das prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos, auxiliando, assim, a atividade fagocitária, estimulando a imunidade celular e aumentando a cicatrização nos tecidos epiteliais [22,150,151].

3.9 Própolis no tratamento de feridas

O uso de produtos herbáceos e plantas medicinais para o tratamento de lesões cutâneas é uma prática muito antiga. Nas últimas décadas, estes foram sendo substituídos pela aplicação de substâncias químicas e sintéticas, que, apesar de efetivas, apresentam deficiências, limitações e efeitos colaterais [152].

Atualmente, uma grande variedade de pesquisas e experimentos têm evidenciado os benefícios dos produtos naturais no tratamento de enfermidades cutâneas devidos aos seus princípios ativos – extraídos com solventes orgânicos, água ou álcoois hidratados – demonstrarem efeitos bioquímicos, moleculares e farmacológicos em curto período de tempo e com menores complicações [152,153].

Flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, polissacarídeos, terpenos, esteroides, saponinas, alcaloides e polifenóis podem exibir, isolada ou conjuntamente, atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana que são os três pilares cruciais para cicatrização de feridas [153]. A ação antimicrobiana tem como objetivo inibir a formação de biofilme dos micro-organismos, por estes serem responsáveis por infecções [22]; o efeito anti-inflamatório inibe as enzimas ciclo-oxigenases, que estão envolvidas na inflamação e são responsáveis pela síntese de prostaglandinas [154]; e os antioxidantes regulam a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERN), cujo excesso leva ao estresse oxidativo e consequente dano estrutural da célula [23,155]. Este conjunto de atividades está associado a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, que são as células predominantes na etapa de reepitelização [153].

Neste cenário, a própolis se enquadra devido em sua composição os flavonoides serem os componentes majoritários. Além de ser usada na medicina tradicional há centenas de anos, cujos relatos se iniciam com os egípcios, persas e romanos. Hipócrates (460-377 a.C.) sugeria o uso da própolis para curar feridas e úlceras internas e externas. Na Renascença, era o ingrediente usado em maior quantidade em pomadas. Nos séculos XIX e XX, a própolis foi um dos campos de pesquisa mais estudados na química. Nos anos 1950, os cientistas provaram que a própolis é uma substância ativa importante na cicatrização de feridas, regeneração de tecido, tratamento de queimaduras, neuro-dermatites, úlceras em pernas, psoríasis, herpes genitália, potencialmente ativo contra dermatófitos, morfeia e prurido [113,155–157].

No tratamento de feridas, Corrêa *et al.* [152] criaram uma lesão em ratos Swiss machos que foram tratados oralmente com doses diárias de solução veículo (2% v/v de

etanol em água, grupo controle) e 100 mg/kg de extrato etanólico de própolis vermelha durante 9 dias consecutivos. Notou-se maior velocidade no fechamento das feridas, assim como diminuição de neutrófilos e macrófagos por mm² na análise do tecido no 10º dia, diminuição na regulação da proteína do fator de transcrição inflamatória pNF-κB e redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-6. Estes resultados mostram o mecanismo molecular específico da atividade anti-inflamatória da própolis vermelha brasileira que reduz a duração da fase inflamatória de feridas.

Elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias são encontradas em úlceras de diabéticos, levando à eventos cicatriciais que resultam em apoptose (“morte”) de fibroblastos e degradação da matriz extracelular, ou seja, a inflamação persiste, retardando a cicatrização ou torna a ferida crônica. No estudo desenvolvido por Hozzein *et al.* [21], aplicou-se estreptozotocina em ratos BALB/c para indução de diabetes mellitus, posterior excisão circular e aplicação tópica do extrato etanólico de própolis proveniente da Arábia Saudita. Os resultados confirmaram que elevadas concentrações de IL-1β, IL-6 e TNF-α (citocinas pró-inflamatórias) retardam a cicatrização dos ratos com diabetes quando comparado com grupo controle (ratos sem diabetes). Percebeu-se que a própolis aplicada nos ratos diabéticos diminuiu o nível destas citocinas, quando comparadas com o controle; e aumento na produção de colágeno via TGF-β1, quando comparado com ratos diabéticos sem propólis.

A dosagem oral de 100 mg/kg por dia de extrato de própolis da Arábia Saudita em ratos BALB/c com diabetes mellitus induzida manteve os níveis plasmáticos normais (grupo controle), tendo-se elevados níveis de IL-2, IL-4, IL-7 (citocinas anti-inflamatórias) e baixos níveis de IL-1β, IL-6, TNF-α, ROS e triglicerídeos quando comparados com o grupo de ratos diabéticos sem ingestão de própolis. Estes dados revelaram que a propólis atenuou o estresse oxidativo e a inflamação, assim como exibiu uma significativa melhora na quimiotaxia diante CCL21 e CXCL12, resultando uma eficiente resposta imune em ratos diabéticos, de acordo com o trabalho de Al Ghamdi *et al.* [158].

Pessolato *et al.* [159] demonstrou, em ratos fêmea (*Rattus norvegicus*) com queimaduras induzidas e histologia dos tecidos, que a pomada contendo 5% de extrato etanólico de própolis atua no processo cicatricial promovendo a reepitelização, anti-inflamação através do debridamento da lesão nos períodos iniciais e estimulação na produção de colágeno durante 21 dias de acompanhamento.

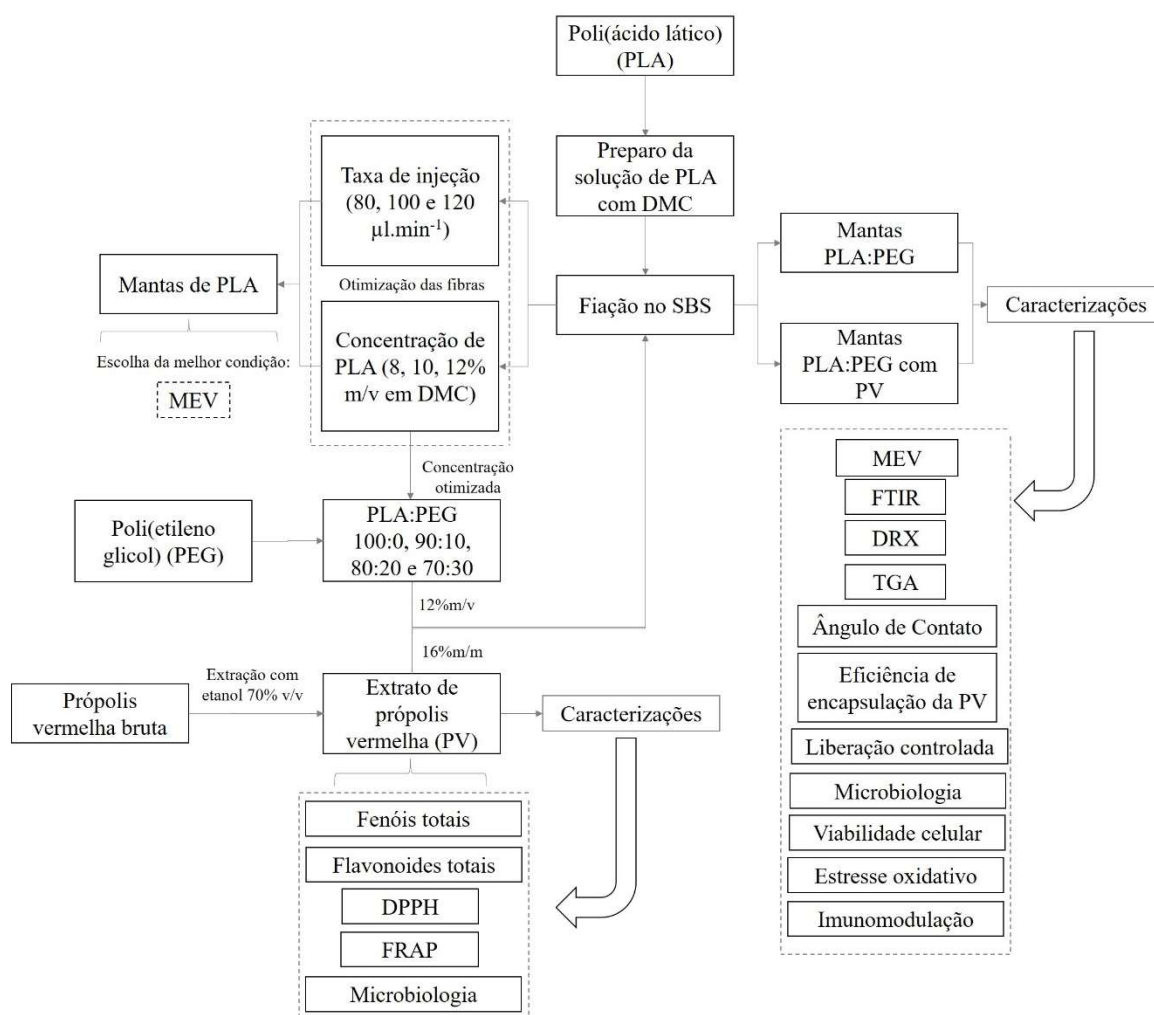
Batista *et al.* [160] também induziram queimaduras em ratos Wistar comparando o efeito do tratamento com pomadas contendo 20% de própolis verde ou vermelha. Observou-se que dentro de 15 dias os grupos tratados com as pomadas diminuíram o grau de inflamação e granulação e aumentou a epitelização ao se comparar com a solução salina (grupo controle). Verificou-se que a própolis não apresentou toxicidade renal ou hepática, mas implicou em efeitos sistêmicos através da diminuição dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicose, que demonstraram ser bem menores do que os do controle.

Em suma, verifica-se que a própolis vermelha possui potencial em ser incorporada e liberada controladamente em fibras de PLA/PEG com a finalidade de desenvolver curativos micro- e nanoestruturados para o tratamento de feridas cutâneas.

4 EXPERIMENTAL

Os procedimentos e ensaios foram realizados no Laboratório Multiusuário de Materiais e Biosistemas (LAMAB) e Laboratório de Solidificação Rápida (LSR), no Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB); no Laboratório de Cultivo e Análise Celular (LACEC), Escola Técnica de Saúde (UFPB); e no Laboratório de Tecnologia e Controle de Medicamentos (LABTCOM), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O fluxograma da Figura 4-1 apresenta as etapas das análises realizadas neste estudo.

Figura 4-1. Fluxograma dos ensaios realizados neste trabalho



4.1 Materiais

Poli(ácido láctico) (PLA) (M_n 125.000 g.mol⁻¹) foi comprado da Biomater (São Carlos, Brasil). Polietileno glicol (PEG) (M_n 8.000 g.mol⁻¹) e dimetilcarbonato (DMC) (<99% de pureza) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Etanol (<99% de pureza, cloreto de sódio (<99% de pureza), cloreto de potássio (<99% de pureza), fosfato de sódio dibásico (<99% de pureza) e fosfato de potássio monobásico (<98% de pureza) foram adquiridos da Química Moderna (São Paulo, Brasil). Ácido gálico (100% de pureza), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (100% de pureza), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (<98% de pureza), cloreto férrico (97% de pureza), resazurina sódica, solução aquosa de 20% digluconato de clorexidina, Histopaque® 1077 (densidade 1,077 g.mL⁻¹) e 1119 (densidade 1,119 g.mL⁻¹), solução aquosa de 0,4% Trypan blue, phytohemagglutinin (PHA-P), zimosan A proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, luminol (<98% de pureza) e placa branca de 96 poços com fundo chato foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Carbonato de sódio anidro, reagente Folin-Ciocalteu 2 mol/L, cloreto de alumínio hexaidratado foram adquiridos da Êxodo Científica (São Paulo, Brasil). Brain Heart Infusion (BHI), tanto ágar e quanto caldo, foram comprados da KASVI (Paraná, Brasil). Meio RPMI 1640 foi comprado da Gibco, Life Technologies, Reino Unido).

4.2 Métodos

4.2.1 *Própolis vermelha*

4.2.1.1 *Limpeza e preparo das amostras de própolis vermelha in natura*

As amostras de própolis vermelha (PV) foram coletadas no mangue localizado no município de Marechal Deodoro, Alagoas (Latitude Sul 9° 42.258' e Longitude Oeste 35° 54.391'). O acesso e transporte foi previamente autorizado pelo CNPq através do protocolo nº. 010124/2012-8 para cumprir a legislação brasileira de Patrimônio Genético e Conversação da Biodiversidade.

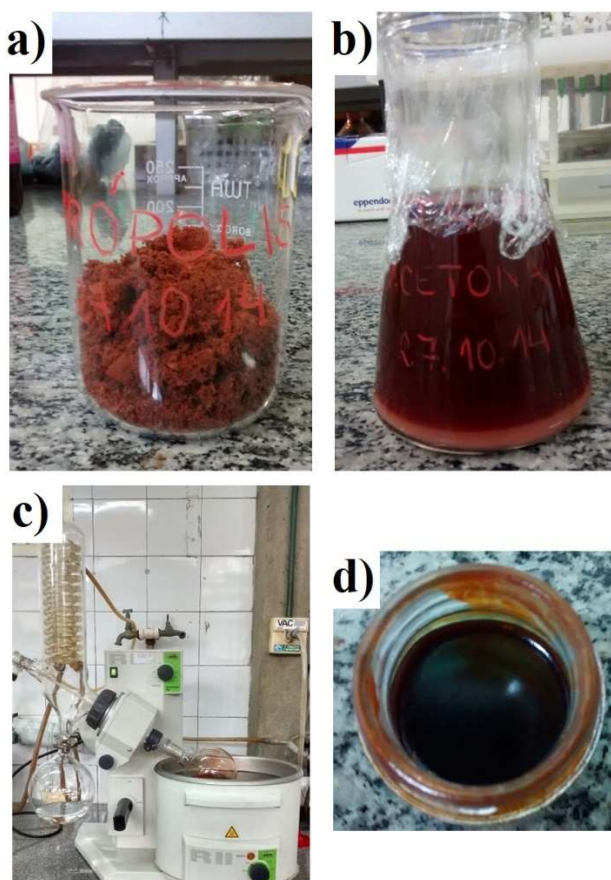
As amostras de PV *in natura* foram limpas, retirando-se poeira, favos de mel, pedaços de madeira, abelhas mortas e qualquer outro tipo de material estranho. As amostras foram embaladas em sacos plásticos transparentes envoltos em papel alumínio,

armazenadas em freezer a -18°C , para deixar a própolis menos dúctil. Em seguida, foi triturada com nitrogênio líquido e pistilo até obtenção de um pó vermelho fino. A PV triturada foi armazenada em sacos plásticos transparentes revestidos com papel alumínio em freezer a -18°C [161,162].

4.2.1.2 Preparação dos extratos

O extrato etanólico de PV foi preparado na proporção 30% m/v em etanol a 80%, à temperatura ambiente, com troca de solvente a cada 48 horas por 6 dias. Ao final das extrações, os extratos foram filtrados em papel de filtro. Os filtrados foram postos em erlenmeyers envoltos por papel alumínio, deixando-os em repouso durante 24h para precipitação e separação das ceras. Em seguida, os extratos foram novamente filtrados em papel de filtro para que houvesse maior separação das ceras. Apenas o filtrado foi seco em evaporador rotativo (50°C ; 120 rpm) (Figura 4-2a-d) [18,162].

Figura 4-2. (a) Própolis vermelha macerada, (b) extratos de PV em etanol após decantação de ceras, (c) rotaevaporação e (d) extrato seco de PV



4.2.2 Fiação por SBS

As soluções poliméricas foram preparadas solubilizando o PLA em dimetilcarbonato (DMC) em agitação magnética até completa solubilização em temperatura ambiente.

Os parâmetros de trabalho adotados foram: distância de trabalho: 250 mm; pressão usada: 20 psi (0,1 MPa); rotação do coletor: 600 rpm; diâmetro do coletor: 76 mm; diâmetro interno da seringa: 15,5 mm; distância de protusão: 2 mm com bico chanfrado; diâmetro externo do bico externo: 3 mm; diâmetro externo do bico interno: 2 mm.

Esses valores foram escolhidos com base em alguns trabalhos da literatura e nas melhores condições experimentais (resultados não mostrados) em que não houve entupimento de bico e/ou formação de filmes no coletor [64,163–165].

Inicialmente, a concentração e a taxa de injeção foram as variáveis do processo submetidas ao planejamento experimental 2^2 com três pontos centrais (Tabela 4-1) para se obter as melhores condições de fiação. As taxas de injeção utilizadas foram 80, 100 e 120 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e as concentrações de PLA em DMC, 8, 10 e 12% m/v. As diferenças estatísticas foram calculadas através do teste paramétrico de Tukey e os efeitos das variáveis em relação ao diâmetro, pela análise de variância (ANOVA).

Tabela 4-1. Planejamento experimental 2^2 para as fibras de PLA com as variáveis concentração *versus* taxa de injeção

	Concentração PLA:DMC	Taxa de injeção	Concentração PLA/DMC, % m/v	Taxa de injeção, $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
1	-1	-1	8	80
2	+1	-1	12	80
3	-1	+1	8	120
4	+1	+1	12	120
5	0	0	10	100
6	0	0	10	100
7	0	0	10	100

Cada solução polimérica foi posta em seringa de 10 mL (diâmetro interno de 15,6 mm), posicionada na bomba injetora na posição horizontal e a seringa foi conectada ao

bico interno através de um capilar. Realizou-se ajuste dos bicos para que o bico mais interno ficasse o mais concêntrico possível com o externo através de parafusos centralizadores (Figura 3-7b).

A partir das melhores condições de fiação do 100PLA/DMC, preparou-se soluções de PLA:PEG nas proporções de 70:30 (70PLA), 80:20 (80PLA), 90:10 (90PLA) e 100:0 (100PLA) (m/m) foram preparadas e diluídas em dimetilcarbonato (DMC). 16% m/m de extrato etanólico seco de própolis vermelha (PV) em relação à massa total de polímeros (ou 24 mg.mL^{-1} de PV em relação ao volume de DMC), também foi acrescentado às soluções poliméricas para obtenção das mantas com PV. Esta concentração foi a mais alta sem que houvesse formação de fase na solução polimérica, ou seja, concentração máxima solúvel em PLA, PEG e DMC.

4.3 Caracterizações

4.3.1 *Própolis vermelha*

4.3.1.1 *Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu*

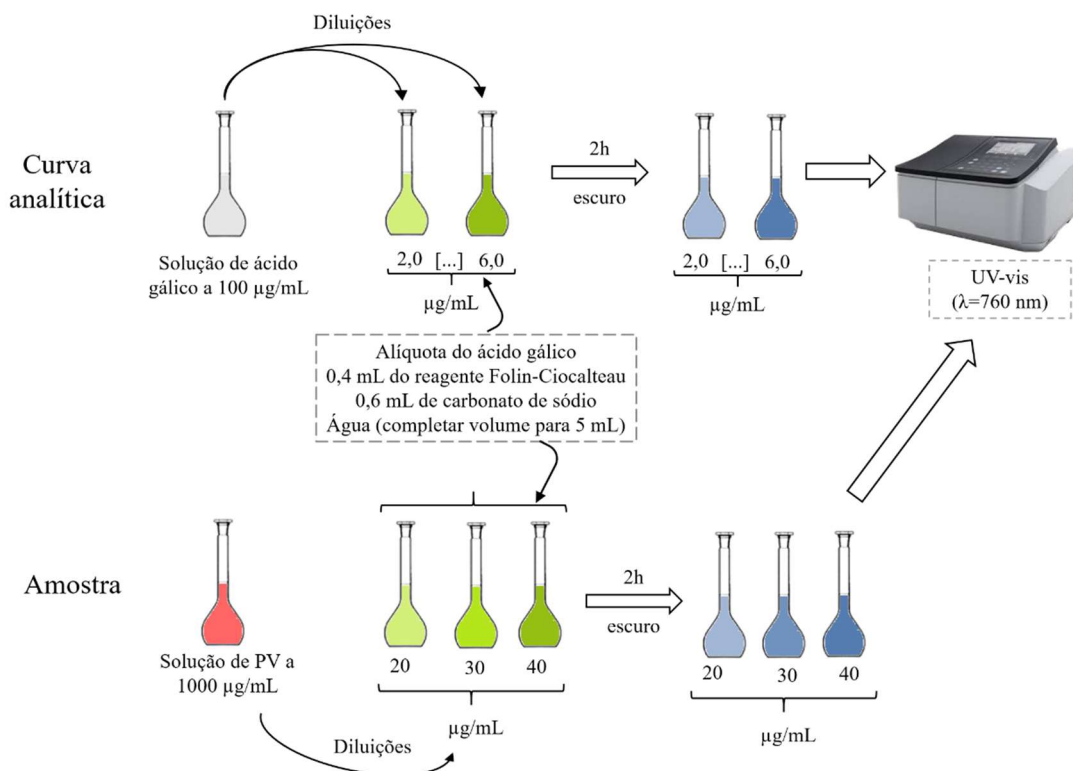
A quantificação de fenóis totais foi realizada de acordo com o método de Folin-Ciocalteu descrito por por Rio [166], Alcântara [167] e Silva [162] com algumas modificações (Figura 4-3). A curva analítica foi construída com a diluição da solução mãe de ácido gálico a $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$ para as concentrações de 2,0 a $6,0 \text{ } \mu\text{g/mL}$ em balões volumétricos de 5 mL, contendo alíquotas correspondentes a cada concentração, 0,4 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 0,6 mL de solução saturada de carbonato de sódio e completou-se o volume com água deionizada. A reação de oxidação dos fenóis aconteceu no escuro por 2 horas em que há alteração de cor de verde para azul. A leitura foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 760 nm. A curva analítica foi medida através do método dos mínimos quadrados associando as absorbâncias lidas (eixo y) com as concentrações de ácido gálico previamente preparadas (eixo x).

Para determinação dos fenóis totais do extrato de própolis, uma solução estoque de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ do extrato foi preparada. Alíquotas correspondentes a 20, 30 e $40 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e utilizou-se a mesma metodologia acima descrita. As leituras realizadas foram relacionadas à curva analítica $y = 0,1536x +$

0,0861 ($R^2 = 0,99$) (detalhes da curva na Figura A1 no Apêndice). Para calcular a porcentagem de fenóis totais:

$$\% \text{Ácidos fenólicos} = \frac{\text{Concentração lida}_{(20,30 \text{ ou } 40 \text{ } \mu\text{g/mL})}}{\text{Concentração}_{(20,30 \text{ ou } 40 \text{ } \mu\text{g/mL})}} \times 100 \quad \text{Equação 4-1}$$

Figura 4-3. Esquema do ensaio de teor de fenóis



4.3.1.2 Determinação do teor de flavonoides totais

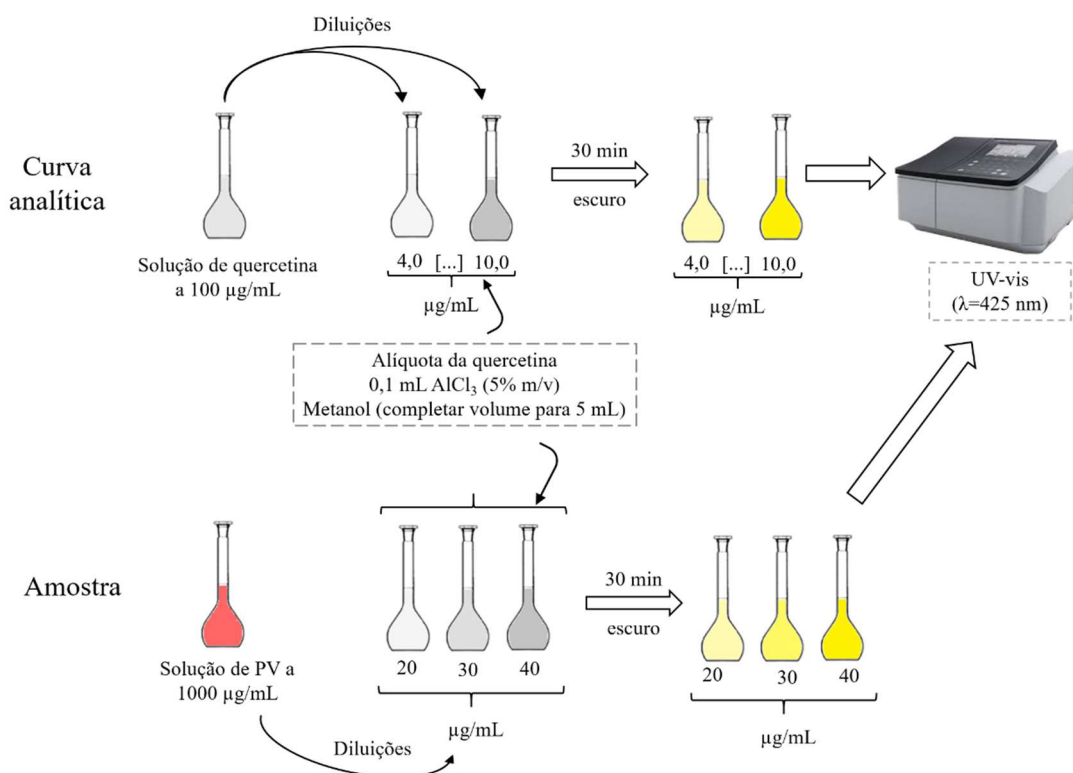
O método foi baseado no descrito por Rio [166], Alcântara [167] e Silva [162] com pequenas alterações (Figura 4-4). A curva analítica foi obtida com quercetina nas concentrações de 4,0 a 10,0 µg/mL em balões volumétricos de 5 mL contendo 0,1 mL de AlCl_3 (5% m/v) e metanol (até o volume final). Após 30 minutos de reação no escuro, realizou-se a leitura no espectrofotômetro em 425 nm. A equação foi dada por regressão linear.

Diluiu-se para 20, 30 e 40 µg/mL a solução estoque de 1,0 mg/mL de própolis vermelho em balões de 5 mL. O mesmo método acima descrito foi utilizado para o extrato de própolis. As leituras realizadas foram relacionadas à curva analítica $y = 0,0712x +$

0,036 ($R^2 = 0,99$) (detalhes da curva na Figura A2 no Apêndice). Para calcular a porcentagem de flavonoides totais:

$$\%Flavonoides = \frac{\text{Concentração lida}_{(20,30 \text{ ou } 40 \mu\text{g/mL})}}{\text{Concentração}_{(20,30 \text{ ou } 40 \mu\text{g/mL})}} \times 100 \quad \text{Equação 4-2}$$

Figura 4-4. Esquema do ensaio de teor de flavonoides



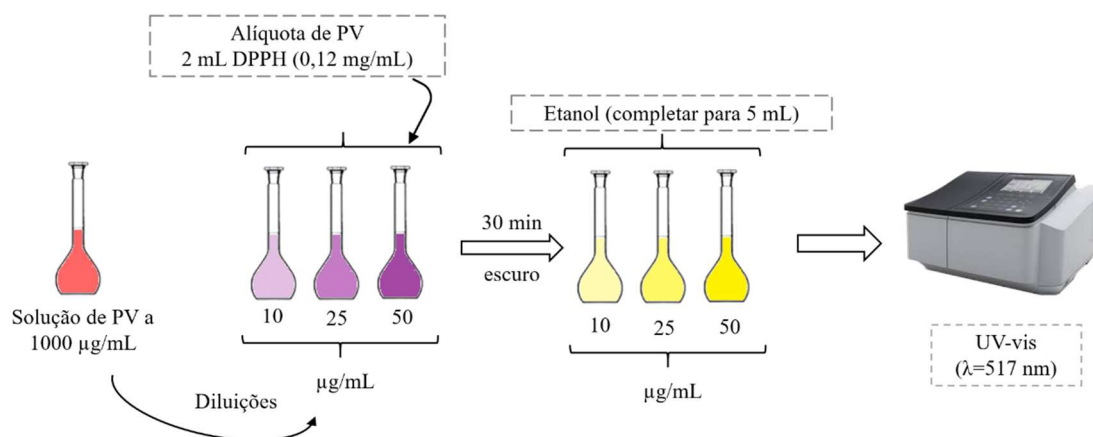
4.3.1.3 Atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH

A atividade sequestrante do radical DPPH foi avaliada de acordo com o descrito por Rio [166], Alcântara [167] e Silva [162] com pequenas alterações (Figura 4-5). Preparou-se uma solução de 0,12 mg/mL de radical DPPH em etanol absoluto e armazenado em vidro âmbar. Adicionou-se 2 mL desta solução em balões volumétricos de 5 mL e alíquotas da solução estoque do extrato de própolis de 1,0 mg/mL para as concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL. Guardou-se as amostras por 30 minutos no escuro para que a reação sequestrante do DPPH acontecesse, desbotando a cor violeta para um tom de amarelo pálido. Após a reação, completou-se o volume com etanol e fez-se a leitura no espectrofotômetro em 517 nm. Os brancos da curva foram feitos com uma

alíquota de etanol e outra de DPPH com etanol. A porcentagem de radical DPPH remanescente foi calculada através da Equação 4.3, em que A = absorção:

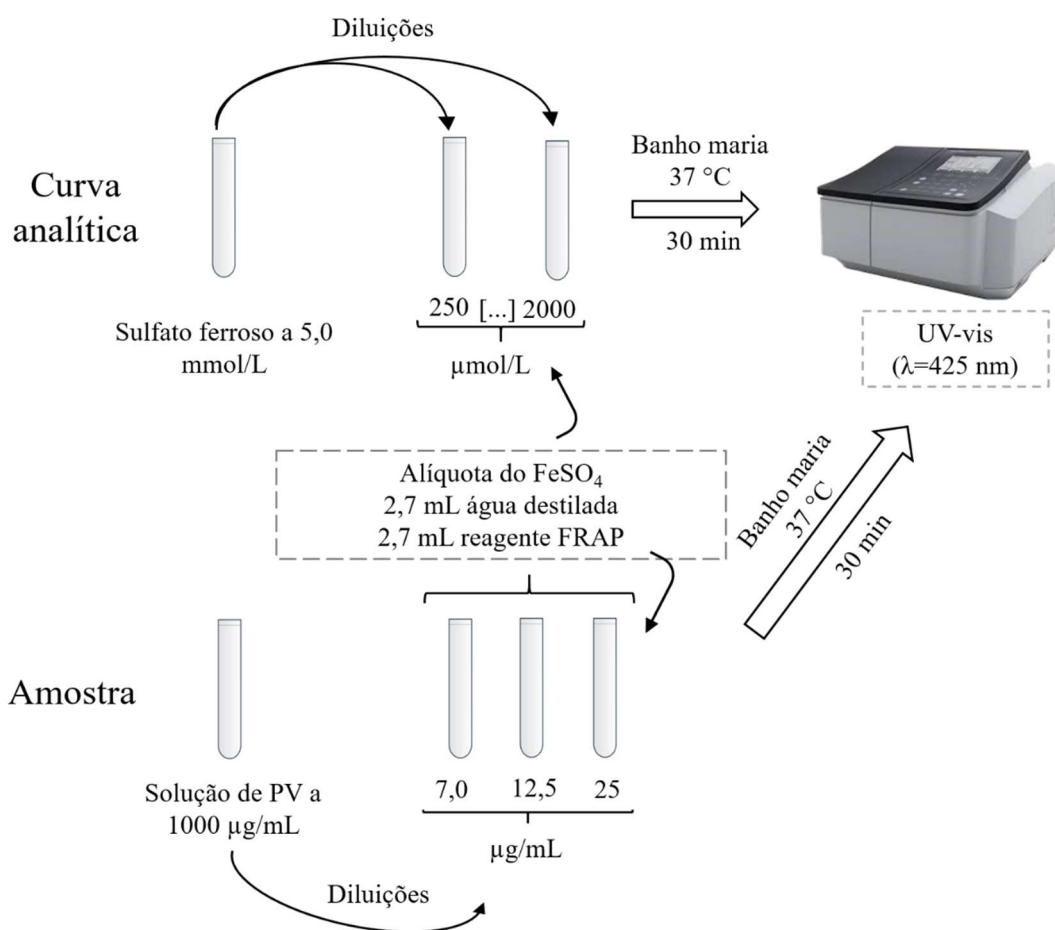
$$\%DPPH \text{ remanescente} = \frac{A_{amostra} - A_{etanol}}{A_{DPPH} - A_{etanol}} \quad \text{Equação 4-3}$$

Figura 4-5. Esquema do ensaio de DPPH



4.3.1.4 Atividade antioxidante pelo poder redutor do ferro FRAP

A capacidade antioxidante de redução do ferro foi determinada pelo método FRAP [167] com adaptações (Figura 4-6). A solução FRAP foi preparada com tampão acetato de 300 mmol/L, 10 mmol/L de TPTZ e 20 mmol/L de FeCl₃. Alíquotas de 7, 12,5 e 25 µg/mL de extrato de própolis foram transferidas para tubos de ensaio e adicionado 2,7 mL de água deionizada e 2,7 mL do reagente FRAP. A mistura foi agitada e mantida em banho maria por 30 minutos a 37 °C. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, amostras e padrões foram lidos no comprimento de onda de 595 nm. A curva analítica foi obtida com sulfato ferroso nas concentrações de 250 a 2000 µmol/L ($y = 0,0005x - 0,07$, $R^2 = 0,99$) (detalhes da curva na Figura A3 no Apêndice).

Figura 4-6. Esquema do ensaio do FRAP

4.3.1.5 Determinação dos marcadores do extrato etanólico de PV por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A identificação dos componentes contidos no extrato etanólico de PV foram realizados através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado com Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) da Shimadzu (Tóquio, Japão). Seus módulos consistem de: bomba de alta pressão (modelo LC-20ADXR), degaseificador (modelo DGU-20A3R), autoinjeter (modelo SIL-20AXR), forno de coluna cromatográfica, detectores de arranjo de diodos (modelo EPDM-20A), detector de fluorescência (modelo RF-20A), controlador (modelo CBM-20A) e o software Shimadzu Labsolution. A separação das frações ocorreu utilizando uma coluna de fase reversa (C 18, 150 mm x 4,6 mm; 5 μm), fase móvel de solvente A (água deionizada) e solvente B (acetonitrila) bombeados a 0,3 mL.min⁻¹. O gradiente de eluição foi realizado utilizando inicialmente 70% de água e 30% de acetonitrila com variação da porcentagem de

acetonitrila a 100% em 40 min seguido de uma condição isocrática com acetonitrila (100%) até 53 min e retorno à condição inicial a 54 min, seguido por acetonitrila isocrático (30%) até 60 min. Este método foi desenvolvido para lavar a coluna durante a análise com 100% de acetonitrila, evitando falta de precisão e exatidão, além de diminuir a incrustação da coluna por compostos não polares.

Pesou-se 2,0 mg dos padrões analíticos de liquiritigenina, daidzeína, pinobanksin, formononetina, bolosontol e biochanina A que foram transferidos para balões volumétricos de 10 mL para obter a solução estoque de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, para determinação dos tempos de retenção, dilui-se para a concentração de $0,50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, filtrou-se com filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e injetou-se $2 \mu\text{L}$ no HPLC.

Para a identificação dos flavonoides do extrato etanólico da PV através da comparação dos tempos de retenção com os padrões analíticos, utilizou-se as mesmas condições acima descritas.

4.3.1.6 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A avaliação da atividade microbiana foi realizada de acordo com as metodologias descritas pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS; Comitê Nacional de Padronização de Laboratórios Clínicos, tradução do inglês) [168,169].

Para o cultivo de *S. aureus* (ATCC 25923), gram positiva, foi realizado o descongelamento das cepas de referência em temperatura ambiente. Em seguida, $50 \mu\text{L}$ do inóculo e 5 mL do meio BHI-Caldo foram colocados em tubos falcon previamente esterilizados, seguido de homogeneização no vórtex (FANEM, São Paulo, Brasil). Os tubos semi-abertos foram postos em estufa bacteriológica (STERILIFER, São Paulo, Brasil), durante 48 horas a 37°C . Após 48h do cultivo, o tubo foi colocado em aparelho centrifugador e centrifugado por 15 minutos na velocidade 2.500 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e ao tubo foi acrescentado 5 mL de solução salina de NaCl 0,9% m/v. Em seguida, a mistura foi homogeneizada no vórtex e realizada a leitura da densidade bacteriana.

As suspensões bacterianas preparadas em solução salina foram padronizadas através de espectrofotômetro (GLOMAX MULTI, Promega, Madison, EUA), no comprimento de onda de 625 nm e valor de absorbância variando entre 0,080 a 0,100 correspondente a concentração de $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC (unidades formadoras de colônias).mL}^{-1}$

¹, equivalente a 0,5 da Escala de MacFarland. Para a leitura, uma placa de 96 poços de fundo chato foi utilizada, onde no primeiro poço foram colocados 100 μ L de salina e no segundo poço, 100 μ L do inóculo previamente preparado.

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o extrato de própolis vermelha em etanol foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, em triplicata. Para tal, o extrato seco foi ressuspensão em etanol na concentração de 100 mg.mL⁻¹ que foi diluído em água deionizada para a concentração de 4,0 mg/mL.

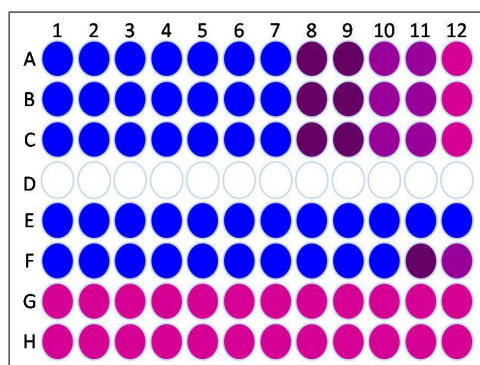
Foram distribuídos 100 μ L de BHI-caldo nos orifícios da placa de microdiluição de fundo chato. Posteriormente, 100 μ L de cada extrato foi transferido para o primeiro poço e diluídos seriadamente a partir da retirada de uma alíquota de 100 μ L da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora, seguindo até o último poço. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 μ L do inóculo na concentração 5.10^5 UFC.mL⁻¹. O controle positivo foi realizado com digluconato de clorexidina na concentração de 2,0 μ g.mL⁻¹, utilizando-se a mesma técnica da microdiluição. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 horas.

Realizou-se paralelo à microdiluição, os controles de viabilidade das cepas com controle de crescimento (CC), cujo poço possuía 100 μ L do meio-caldo e 100 μ L de cada inóculo; controle de esterilidade do meio (CEM) com 100 μ L do meio-caldo; controle de esterilidade das amostras (CE) com 100 μ L de cada extrato mais 100 μ L de meio-caldo; e controle negativo (CN) com etanol e 100 μ L de meio-caldo.

A leitura para determinação da CIM foi feita a partir do método visual, levando em consideração a formação ou não de aglomerados de células no fundo da cavidade da placa de microdiluição. Dessa forma, a CIM foi considerada a menor concentração do produto em teste capaz de inibir o crescimento das cepas utilizadas nos ensaios microbiológicos [170].

Para a confirmação do resultado visual, ou seja, para confirmar a presença de microrganismos viáveis nas concentrações inibitórias, 30 μ L do corante Resazurina Sódica foram adicionados como indicador de óxido-redução, o qual indica alteração de pH. Após 1 hora da aplicação do corante a placa foi avaliada e tabulado os resultados (Figura 4-7).

Figura 4-7. Desenho esquemático da leitura visual após aplicação da resazurina sódica.



As linhas A, B e C representam o ensaio da microdiluição das substâncias-teste em triplicata. Os poços A7, B7 e C7 representam a CIM. Os poços rosa-violáceo ou rosa indicam a presença de crescimento bacteriano. As linhas E, F, G e H representam os controles de Esterilidade, Positivo, Crescimento e Negativo, respectivamente. Os poços 5, 6 e 7 das linhas A, B e C, correspondentes a CIM, CIMx2 e CIMx4, respectivamente, e foram replaqueadas para obtenção da CBM. Fonte: Panmela Pereira Maciel [171].

As Concentrações Bactericidas Mínimas (CBMs) dos extratos e do controle positivo foram determinados a partir do resultado da CIM, no qual foi realizado o subcultivo de 10 µL da concentração correspondente à inibitória e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIM x 2 e CIM x 4) [172] em placas de petri contendo meio sólido (BHI-ágar). Após 48 horas de incubação a 37°C, foram realizadas as leituras das CBM, considerada a menor concentração que impediu o crescimento visível do subcultivo [170].

4.3.2 Fibras por SBS

4.3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das fibras foi observada utilizando um microscópio eletrônico de varredura, modelo Leo 1430 da Zeiss. Previamente, as amostras foram metalizadas com duas camadas de ouro, com 90 segundos para cada recobrimento, em um “Sputter Coater” da Emitech, modelo KSSOX, em atmosfera de argônio. Os diâmetros das fibras foram medidos com o auxílio do software analisador de imagens “Image J”, *National Institutes of Health*, EUA. Foram efetuadas 100 medidas aleatórias para cada amostra.

4.3.2.2 *Infravermelho com Transformada de Fourier*

A caracterização química das mantas foi realizada usando discos de KBr contendo 2% (m/m) de amostras. O número de onda varia de 4000 cm^{-1} a 600 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , 20 varreduras e modo de transmitância. O espectro foi realizado no espectrofotômetro FTIR-8000, IRAffinity-1, Shimadzu (Kyoto, Japão).

4.3.2.3 *Difração de Raio X (DRX)*

A difração de raio X foi realizada no difratômetro modelo XRD-6000, Shimadzu (Tokyo, Japão), com potência de 2 kVA, voltagem de 30 kV, corrente de 30 mA e radiação Ka do cobre ($\lambda = 0,154\text{ nm}$). As varreduras foram realizadas no intervalo de 10° a 30° , com passo de $0,01^\circ$ e velocidade de $1,7^\circ.\text{s}^{-1}$.

4.3.2.4 *Termogravimetria*

A estabilidade térmica das mantas foi realizada em um analisador termogravimétrico da TA Instrument, Q500 (New Castle, EUA), usando cerca de 10 mg de amostra que foram aquecidas até 600°C sob atmosfera de nitrogênio a uma vazão de 50 mL.min^{-1} e taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$.

4.3.2.5 *Ângulo de contato estático com água*

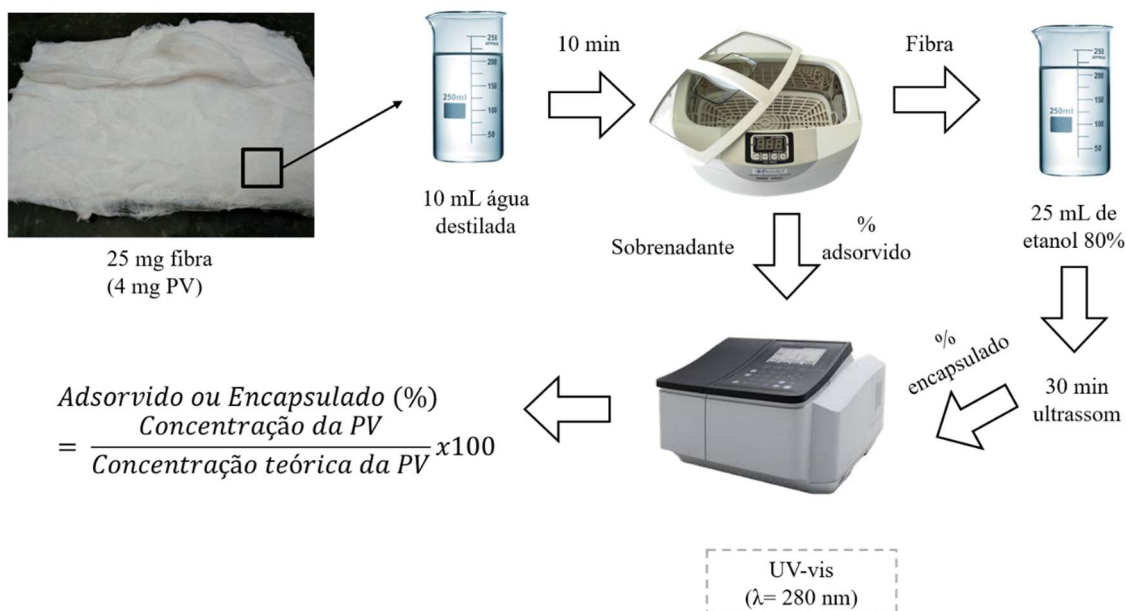
A molhabilidade foi realizada através de fotos (Câmera Fujifilm S3300, Tóquio, Japão) nos tempos de 0 a 120 s de fibras ($n=6$) com diâmetro de 6 mm em que se gotejou aproximadamente $5\text{ }\mu\text{L}$ de água destilada. Para o extrato etanólico de PV, uma quantidade de aproximadamente 10 mg foi espalhada sobre uma lâmina de vidro até formar uma fina camada. O ângulo formado foi medido no software analisador de imagens “Image J”, *National Institutes of Health*, EUA.

4.3.2.6 *Adsorção na superfície e eficiência de encapsulamento*

A eficiência de encapsulamento foi feita com base no descrito por Wang *et al.* [173], com algumas modificações (Figura 4-8). Para adsorção na superfície, cerca de 25 mg de fibra (correspondendo a 4 mg de PV) foi lavada com 10 mL de água deionizada

para remover o excesso de PV na superfície, seguido de ultrassom por 10 minutos. Depois, a fibra foi dissolvida em 25 mL de etanol 80% em posto em ultrassom por 30 min, para eficiência de encapsulamento.

Figura 4-8. Esquema da porcentagem de PV adsorvido e encapsulado nas fibras



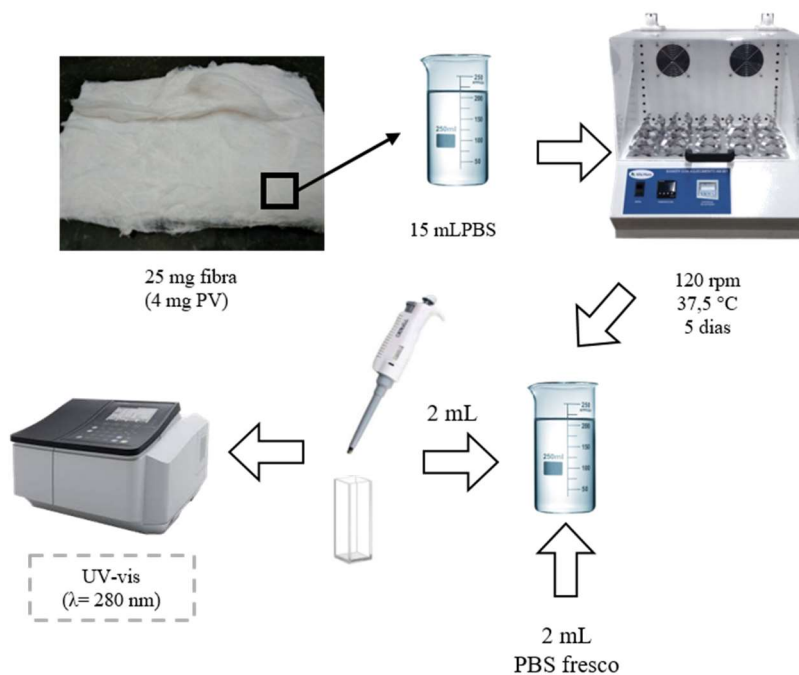
A quantidade de PV na solução foi medida através do teor de flavonoides totais por dissolução do princípio ativo no comprimento de onda de 280 nm (espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japão). A curva analítica foi construída resuspendendo em 1:1 etanol absoluto:PBS (0,002 mol.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,003 mol.L⁻¹ de KCl, 0,01 mol.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 0,1 mol.L⁻¹ de NaCl, pH 7,5), o extrato seco da PV na concentração de 1,0 mg/mL e diluindo a solução estoque em PBS para a faixa de 0,5 a 50 µL.mL⁻¹ ($y=0,0192x + 0,1143$, $R^2 = 0,99$) (detalhes da curva na Figura A4 no Apêndice). Tanto a adsorção na superfície quanto a eficiência de encapsulação foram calculadas pela equação a seguir:

$$\begin{aligned} \text{Adsorvido ou Encapsulado (\%)} \\ = \frac{\text{Concentração da PV}}{\text{Concentração teórica da PV}} \times 100 \end{aligned} \quad \text{Equação 4-4}$$

4.3.2.7 Perfil de liberação *in vitro*

O perfil de liberação das fibras de PV-PLA-PEG foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Huynh *et al.* [174], Seif *et al.* [70] e Wang *et al.* [173], com algumas modificações (Figura 4-9). 25 mg de fibra (correspondendo a 4 mg de PV) foi posta em 15 mL de PBS sob agitação orbital (tipo *shaker*) de 120 rpm em por 5 dias a 37°C em incubadora, em triplicata. Alíquotas de 2 mL eram retiradas em tempos pré-determinados para leituras no UV-vis e 2 mL de PBS fresco era repostado na fibra. As leituras das alíquotas foram realizadas como descritas no item 4.3.9 sobre a eficiência de encapsulação.

Figura 4-9. Esquema do ensaio de liberação controlada *in vitro*



A concentração de PV no meio é dada pela leitura direta do espectrofotômetro. Já a capacidade de a fibra liberar a PV é dada pelo cálculo das concentrações cumulativas lidas (C_c) através da Equação 4-5 [175,176], uma vez que o volume do meio é repostado causando diminuição da concentração de PV:

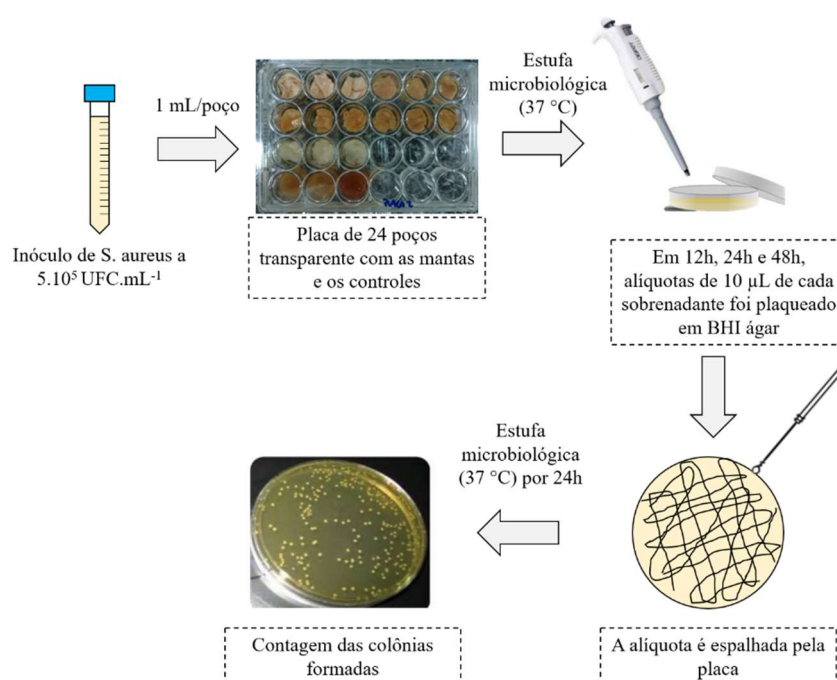
$$C_c = \left[\left(\frac{C_t}{C_o} \cdot f \cdot 100\% \right) - C_{t-1} \right] + \sum C_{t-1} \quad \text{Equação 4-5}$$

Em que C_t é a concentração de PV liberada em um tempo (t) arbitrário; C_o é a concentração teórica de PV na fibra; f é o fator de correção da diluição de 2 mL que equivale à razão volume de diluído pelo volume da amostra (15 mL e 13 mL, respectivamente); C_{t-1} é a concentração anterior ao tempo arbitrário.

4.3.2.8 Cinética de inibição de *Staphylococcus aureus*

Para verificar a interferência das mantas incubadas com *S. aureus*, adotou-se o método de contagem de células viáveis descrita por Alves *et al.* [177]. Aproximadamente 50 mg de fibra (equivalendo a 8 mg de PV), em triplicata, foi imersa em 1 mL de inóculo na concentração de 5.10^5 UFC.mL⁻¹ em placa transparente de 24 poços. Os controles do ensaio foram realizados com digluconato de clorexidina na concentração de 2,0 µg.mL⁻¹ (positivo); o inóculo (negativo); e o meio de cultura (esterilidade). As amostras foram incubadas a 37°C durante todo o ensaio. Aliquotas de 10 µL eram retidas em tempos determinados e espalhadas em placas de BHI ágar que seguiam para estufa por 24h. A leitura do número de colônias foi realizada (Figura A5) e calculada como log₁₀ UFC.mL⁻¹. Para comparar o efeito das mantas em relação ao controle de crescimento, foi calculada a razão entre o log₁₀ UFC/mL das mantas e o log₁₀ UFC/mL do inóculo vezes 100 para cada intervalo de tempo (Figura 4-10).

Figura 4-10. Esquema da cinética de inibição



4.3.2.9 Citotoxicidade

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPB, subordinado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Conselho Nacional de Saúde sob o nº. 88942218.0.0000.5188, cujo certificado de apresentação para apreciação ética se encontra na Seção 5 do Apêndice.

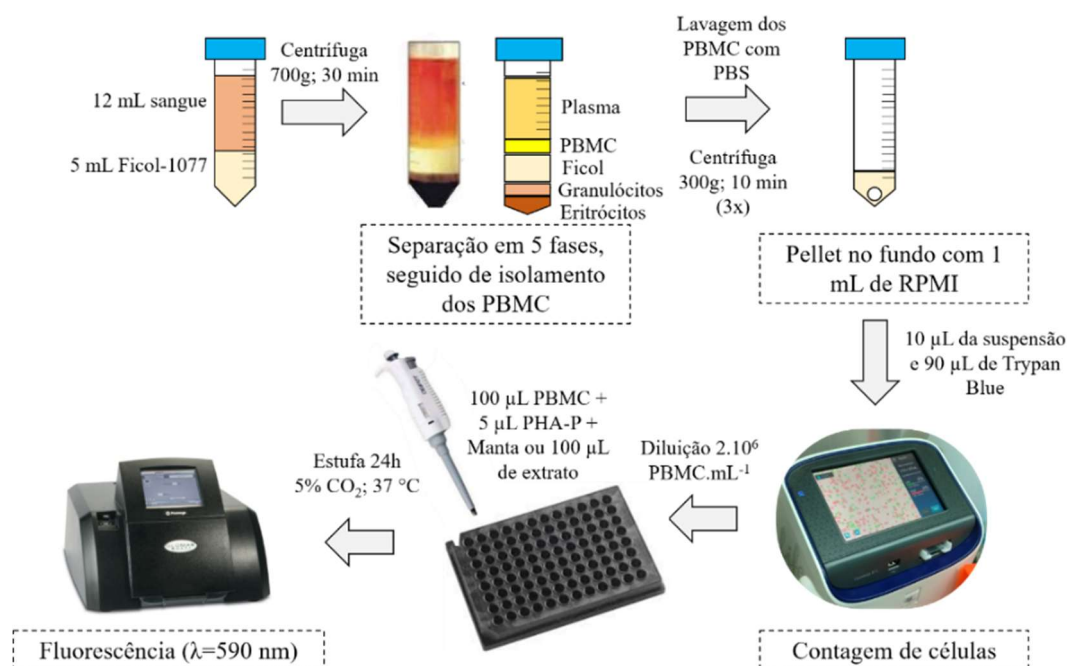
O ensaio de viabilidade celular foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Lima [178]. Para obtenção das células sanguíneas, três voluntários do sexo masculino, soronegativos para HIV e HCV, vacinados contra HBV, sem sinais ou sintomas de infecções agudas durante o tempo de coleta e isolamento do PBMC assinaram um termo de consentimento para participar da coleta de sangue de acordo com a Declaração de Guia Ético de Helsinki.

O sangue total heparinizado foi coletado por punção venosa e processado pelo Histopaque® 1077, os gradientes de densidade para centrifugação foram realizados de acordo com as orientações do fabricante. As células sanguíneas mononucleares periféricos (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, em inglês, PBMC) foram lavadas três vezes com tampão fosfato e contados com trypan blue pelo método de exclusão em câmara de Neubauer com viabilidade $\geq 95\%$. As células foram ressuspensas em alíquotas iguais de $2 \cdot 10^6$ de PBMC/mL em RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de PenStrep e 1% de 20 mM HEPES.

100 μ L da suspensão dos PBMC foram estimulados com 5 μ g/mL de PHA-P e incubadas com 100 μ L do PV na concentração de 100 μ g/mL que foram seriadamente diluídas em placas negras de poliestireno com fundo chato por 24 h a 37 °C com atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Discos de 6 mm das mantas foram imersos nas soluções anteriormente descritas.

A viabilidade celular foi medida usando alamarBlue® de acordo com o protocolo do kit (Bio-Rad, Hercules, EUA). A fluorescência foi medida no leitor de microplacas (GloMax®-Multi, Promega, Madison, EUA) no comprimento de onda de 590 nm. A porcentagem da citotoxicidade é dada pela razão de leituras entre as amostras e as células (controle positivo) vezes 100 (Figura 4-11).

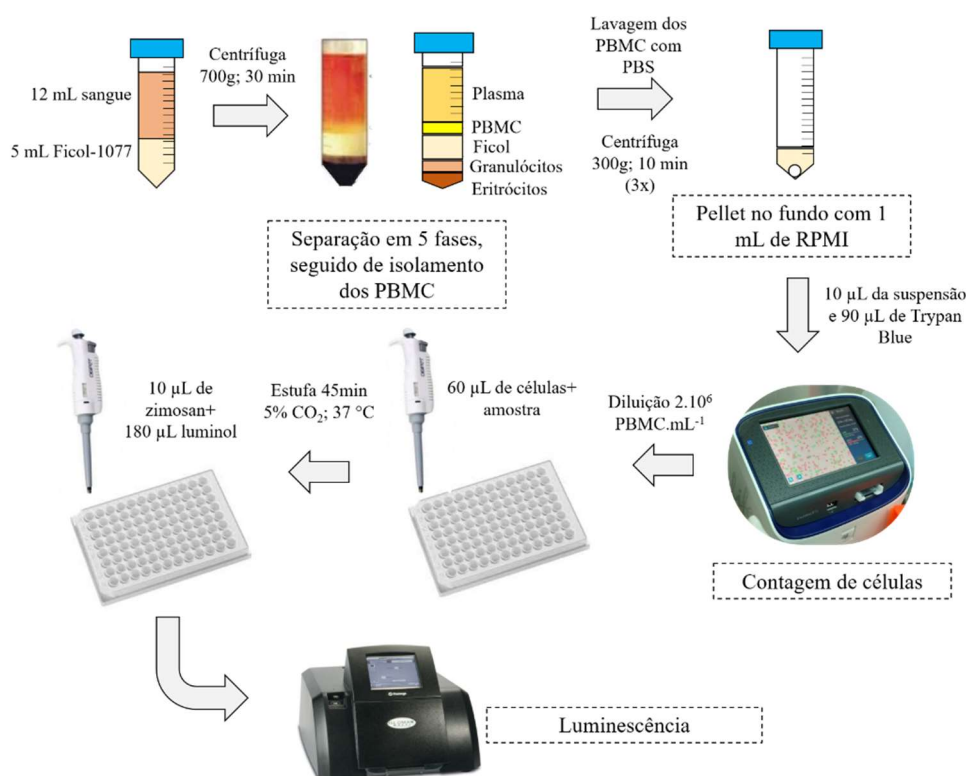
As fibras utilizadas neste ensaio foram escolhidas mediante a melhor condição de liberação controlada de PLA/PEG e foram incorporadas 0; 0,25; 0,5; 1,0 e 16% de PV.

Figura 4-11. Esquema do ensaio de viabilidade celular

4.3.2.10 Estresse oxidativo

Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) intra e extracelulares foram analisadas pelo aumento de quimioluminescência do luminol. Uma suspensão contendo 2.10^6 células/mL de PBMC foram incubadas por 45 minutos, a 37 °C e 5% de CO₂ com o extrato de PV a $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e discos de 6 mm da manta 80PLA com e sem 0,25% m/m de PV (80PLA+PV) em placa branca de 96 poços com fundo chato. PBMC com e sem zimosan opsonizado (13 mg.mL^{-1}) foram os controles positivos e negativos, respectivamente. Depois da incubação, $1.10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de luminol foi adicionado e a quimioluminescência medida em intervalos de 2 minutos através do leitor de microplacas GloMax[®] por um período de 1 hora a 37 °C. A quimioluminescência foi expressa em Unidades Relativas de Luz (URL) [178] (Figura 4-12).

As fibras com melhor condição de liberação controlada e viabilidade celular foram as escolhidas para este ensaio.

Figura 4-12. Esquema do ensaio de estresse oxidativo

4.3.2.11 Dosagem de citocinas

Células de PBMC na concentração de 10^6 células/mL foram cultivadas por 24h em placas de 48 poços com concentração subtóxica de PV e as mantas de PLA/PEG com PV a 37°C em 5% de CO₂. O sobrenadante das culturas de PBMC com ou sem estímulo de PHA (5 µg/mL) foram analisados usando o ensaio de Elisa-Sanduíche da BD Biosciences (Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) para as interleucinas (IL) 4, 6 e 10 e os fatores de necrose tumoral (TNF- α) e transformação de crescimento (TGF- β).

O método se resume em colocar nos poços 25 µL do diluente de ELISA, seguido de 50 µL da amostra ou do padrão que fica incubada por 2h a temperatura ambiente. O sobrenadante é aspirado e lavado 5 vezes. Adiciona-se 50 µL da solução de trabalho do detector em cada poço, cuja incubação leva 1h em temperatura ambiente. O sobrenadante é novamente aspirado e lavado 7 vezes. Adiciona-se 50 µL do substrato que fica incubado por 30 minutos. Acrescenta-se 25 µL da solução de parada em cada poço. As leituras são realizadas no comprimento de onda de 450 nm. As leituras das amostras são interpoladas na curva analítica das citocinas.

4.4 Análise estatística

Os diâmetros das fibras de PLA foram analisados pela análise de variância (ANOVA) para o planejamento experimental e o teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn post hoc para determinar diferenças estatísticas entre as mantas de PLA-PEG-PV. O teste de Tukey foi aplicado para verificar se as mantas possuíam diferença significativa nos ensaios de molhabilidade e eficiência de encapsulação. Para a viabilidade celular e estresse oxidativo, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn post hoc. No ensaio com as citocinas se aplicou o teste de Holm-Sidak. O software usado para estas avaliações foi o GraphPad Prism 7 (San Diego, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Própolis vermelha

5.1.1 *Rendimento do extrato etanólico de própolis vermelha*

O extrato etanólico de própolis vermelha foi preparado usando 30 g de PV *in natura* trituradas misturados a 100 mL de etanol 80% (v/v). A extração foi feita com troca do etanol em 3 ciclos de 48 h cada e deixados em repouso por 24 horas. No dia seguinte, o extrato foi filtrado em papel de filtro e concentrado em evaporador rotativo (40°C, 120 rpm). Obteve-se, assim, o extrato de própolis vermelha em etanol (PV) com rendimento de 72% (m/m).

5.1.2 *Determinação de fenóis totais e flavonoides totais*

A utilização de ensaios que quantifiquem os fenóis e flavonoides tem o objetivo de identificar o perfil dos componentes presentes em extratos vegetais em geral. Logo, a Tabela 5-1 mostra as quantidades dessas famílias de antioxidantes. Esses valores expressam que a PV é composta por 22,1% de ácidos fenólicos representados pelo ácido gálico e 3,9% de quercetina, correspondendo à flavonoides.

Os valores encontrados podem estar associados à formononetina, a liquiritigenina e quercetina no caso dos flavonoides e o ácido cafeico (fenólicos) que são os componentes majoritários da PV do estado de Alagoas [18], sendo, assim, estes componentes são ditos como marcadores da PV.

Observa-se que o extrato de PV está dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira descritos no Anexo VI da Instrução Normativa nº. 3, de 19 de janeiro de 2001, do Ministério da Agricultura [179] que estabelece o mínimo de 0,5 e 5,0% (m/m) de flavonoides e fenóis para extratos etanólicos de própolis.

Tabela 5-1. Fenóis e flavonoides totais do PV

Fenóis totais		Flavonoides totais	
mg de ácido gálico/mL	% (m/m)	mg de quercetina/mL	% (m/m)
7,5 ± 0,6	22,1 ± 2,0	2,8 ± 0,9	3,9 ± 0,2

5.1.3 Avaliação da atividade antioxidante

Compostos antioxidantes, como os fenóis, catequinas, flavonoides e ácidos provenientes de recursos naturais, possuem o poder de inibir a formação de radicais livres, impedindo a fase de iniciação e propagação através da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio ao meio, interrompendo cascatas de oxidação [180–182].

Desta forma, um dos mecanismos de inibição de radicais livres é feita por DPPH. Este método mede o quanto, em porcentagem, que os radicais foram inibidos. Nesta quantificação da atividade antioxidante de substâncias, tem-se que o antioxidante sequestra o radical do DPPH, estabilizando esta molécula, ou seja, a porcentagem desta conversão que gera o poder antioxidante da substância que, em geral, reage melhor através a presença de grupos -OH de flavonoides ou de ácidos aromáticos [183–185].

Outro mecanismo de inibição radicais livres pode ser medido pelo poder de redução do metal, FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Potential*, em inglês). O mecanismo de ação é de oxirredução através da doação de elétrons da substância para reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , promovendo a terminação das reações dos radicais livres. [167,186,187]. Acredita-se que a presença de dois ou mais grupos -OH nas estruturas fenólicas dos antioxidantes, promovam maior atividade antioxidante [188].

A Tabela 5-2 mostra os resultados da avaliação da atividade antioxidante para o extrato etanólico de PV pelos métodos de DPPH e FRAP. Esses valores representam que com 10 $\mu\text{g/mL}$ de PV, 68,2% dos radicais livres foram inibidos através do mecanismo de sequestro de elétrons.

Para o FRAP, que quantifica a capacidade de determinada substância em reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} , tem-se que com 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de PV há uma conversão de $2012 \pm 187 \text{ mmol.g}^{-1}$ de Fe^{2+} .

Desta maneira, a própolis vermelha de Alagoas, que foi usada neste trabalho, se apresentou mais ativa contra oxidação em comparação com a própolis vermelha de Pernambuco trabalhada por Neves [161], cujos valores foram $\text{CE}_{50}=32,9 \mu\text{g/mL}$ para o DPPH e $3636 \text{ mmol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$ para 220 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico de PV. A própolis vermelha trabalhada por Alencar *et al.* [131] foi coletada também de Alagoas, assim como a de da Cruz Almeida *et al.* [18], contudo os valores de DPPH foram 57% para 90 $\mu\text{g PV/mL}$ e 98,1% para 50 $\mu\text{g PV/mL}$, respectivamente. Esta diferença pode ser atribuída à

forma de preparo do extrato etanólico, ao local do apiário, assim como à estação do ano em que a coleta foi realizada [120].

Tabela 5-2. Avaliação da atividade antioxidante do PV pelos métodos de DPPH e FRAP

DPPH		FRAP	
PV, µg/mL	Atividade antioxidante, %	PV, µg/mL	Fe ²⁺ , mmol/g
10	68,2 ± 0,3	7	814 ± 160
25	87,4 ± 9,0	12,5	1304 ± 162
50	95,1 ± 2,4	25	2012 ± 187

Benzie e Strain [186] sugerem que pode haver associação entre os métodos antioxidantes por DPPH e FRAP com os testes intracelulares por ROS, uma vez que nestas metodologias os radicais livres são sequestrados.

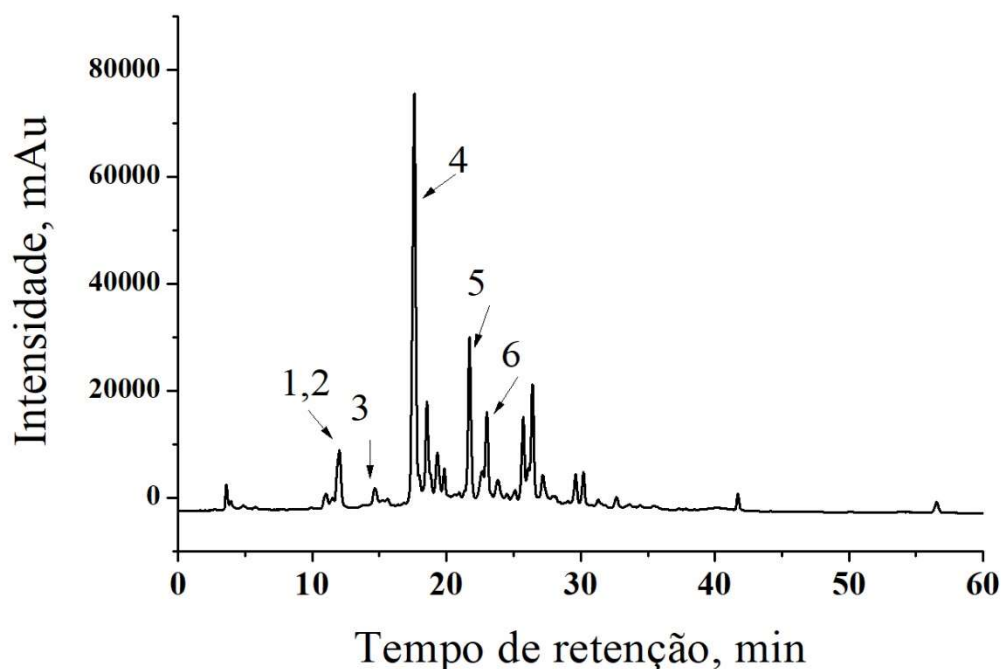
Acredita-se que a suplementação de antioxidantes pode reduzir os riscos de desordens como problemas coronários no coração ou câncer [186] e que pode inibir o ataque de radicais livres nos glóbulos vermelhos do sangue, uma vez que o oxigênio transportado por esse tipo de célula pode promover a sua própria oxidação através dos ácidos graxos poli-insaturados, que estão presentes nas membranas celulares [188].

5.1.4 Determinação dos marcadores do extrato etanólico de PV por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE tem por objetivo a identificação dos componentes isolados presentes em determinada amostra através de sua separação e comparação com substâncias-padrão mediante a uma mesma programação de fase estacionária e móvel [189,190].

A Figura 5-1 ilustra o perfil cromatográfico do extrato etanólico de própolis vermelha, cujos marcadores foram comparados com os padrões isolados. A presença de diversos picos mostra a complexa composição deste produto natural, em que se observa através das intensidades dos sinais que a formononetina é o componente majoritário (tempo de retenção, TR = 17,5 min), seguido de bolosontol (TR = 21,0 min), biochanina A (TR = 22,7 min), sobreposição de liquiritigenina com daidzeína (TR = 11,7) e pinobanksin (TR = 14,0 min).

Figura 5-1. Determinação de marcadores do extrato etanólico de PV por CLAE.



Identificação dos flavonoides: 1. liquiritigenina, 2. daidzeína, 3. pinobanksin, 4. formononetina, 5. bolosontol, 6. biochanina A.

Estas substâncias e suas proporções foram encontradas nos trabalhos de Almeida et al. [18], Dausch et al. [127], Frozza et al. [191] e Nascimento et al. [192] de própolis vermelha dos estados da Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba. Estes compostos são os responsáveis pelas concentrações anteriormente descritas de teor de flavonoides e fenóis e as atividades antioxidantes por DPPH e FRAP. Acredita-se que estes componentes estejam associados à atividade antiviral, anti-inflamatória, anticâncer e imunomodulatória [149].

5.1.5 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os resultados da CIM e CBM estão apresentados na Tabela 5-3. O extrato de própolis apresentou atividade inibitória sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* (gram-positiva).

Tabela 5-3. Valores de CIM e CBM do extrato de própolis em etanol

Micro-organismos	CIM, $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CBM, $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Gram-positivo		
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	125	500

Os valores encontrados para *S. aureus* neste trabalho estão abaixo dos encontrados para própolis vermelha de Pernambuco estudada por Das Neves *et al.* [19] que obtiveram CIM de 256 $\mu\text{g/mL}$ e próximos aos reportados por Alencar *et al.* [20], que variou de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$; e por Cabral *et al.* [132], 62,5 a 125 $\mu\text{g/mL}$. Variações de localidade, clima, estação do ano e método de extração da própolis fazem com que diferentes valores de CIM e CBM possam ser encontrados [119].

Observa-se na literatura que bactérias gram-positivas geralmente são mais sensíveis à ação dos extratos de PV do que as gram-negativas, ou seja, concentrações inibitórias mais altas foram encontradas para estas do que para aquelas [119,193,194]. Acredita-se que esta diferença se deva à parede celular das bactérias gram-positivas serem mais simples, fazendo com que os antibióticos tenham acesso mais fácil ao interior da célula bacteriana [194].

5.2 Mantas de PLA/PEG sem e com PV

5.2.1 Otimização dos parâmetros de fiação para as fibras de PLA

A Figura 5-2 mostra as micrografias das fibras de PLA obtidas no planejamento 2^2 (Tabela 4-1) e a Figura 5-3, o *boxplot* dos diâmetros das fibras, em que se avaliou a influência da concentração polímero/solvente (PLA/DMC) e a taxa de injeção da solução polimérica no SBS representando, dentre as variáveis de fiação, o parâmetro de solução e de processo, respectivamente [53].

Observa-se que a fibra com 8% m/v PLA em DMC fiada a uma taxa de injeção de 80 $\mu\text{L.min}^{-1}$ (-1,-1) (Figura 5-2a) possui fibras orientadas com baixa densidade, larga distribuição de diâmetros (Figura 5-3) que medem 221 ± 135 nm (média $\pm$ desvio padrão), além de apresentarem alguns *beads*. Para a mesma concentração com vazão de 120 $\mu\text{L.min}^{-1}$ (-1,+1) (Figura 5-2b), seus diâmetros foram de 215 ± 99 nm (Figura 5-2d), com orientações diversas e aumento do número de *beads*. Portanto, mesmo aumentando a taxa

de injeção não há diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros das fibras ($p>0,05$) (Figura 5-3).

As mantas com 10% m/v PLA em DMC fiadas a taxa de injeção de $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,0) (Figura 5-2c) apresentaram orientação definida, apesar de estarem enoveladas, possuírem *beads*, fibras grudadas uma na outra e faixa de diâmetros estreita com 160 ± 60 nm. O aumento de concentração de 8% para 10% de PLA fez com que os diâmetros das fibras diminuíssem, sendo estatisticamente diferentes ($p<0,05$) (Figura 5-3).

Para as mantas com 12% m/v PLA em DMC com taxa de injeção de $80 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (+1,-1) (Figura 5-2d), as fibras apresentaram orientações cruzadas com sentidos longitudinais e transversais; diâmetros de 329 ± 115 nm; e presença de poucas fibras coladas umas nas outras. O aumento na taxa de injeção para $120 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (+1,+1) (Figura 5-2e) promoveu fibras enoveladas, sem orientação preferencial e diâmetros de 383 ± 147 nm. O aumento da taxa de injeção na concentração de 12% não promoveu diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros ($p>0,05$). Contudo, o aumento da concentração de PLA foi significativa ($p<0,05$) (Figura 5-3).

As diferentes morfologias das fibras que podem ser obtidas dependem dos parâmetros da solução, do processo e do ambiente. Geralmente, a presença de *beads* e fibras coladas umas nas outras está associada à evaporação incompleta do solvente, seja devido à sua alta temperatura de volatilização deste, uma vez que o SBS requer uma alta taxa de evaporação do solvente para que as gotas que saem do bico cheguem secas e estiradas ao coletor [57]; aos ajustes de distância de trabalho e pressão; ou à baixas concentrações de polímero, que promovem diminuição da viscosidade e consequentemente baixo emaranhamento entre as cadeia poliméricas [61].

Mediante a estes resultados, acredita-se que a concentração polimérica seja o fator principal para as fibras obterem essas morfologias, uma vez que com o aumento da concentração a presença de *beads* diminuiu consideravelmente, prevalecendo as formas lineares, como encontrado por Lee *et al.* [195] ao fiar poliestireno por *electrospinning*.

Figura 5-2. Morfologia e distribuição dos diâmetros das fibras de PLA nas variáveis concentração e taxa de injeção. Fibra 8% m/v PLA em (a) $80 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ e (b) $120 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$; (c) 10% m/v PLA em $100 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$; 12% m/v PLA em (d) $80 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ e (e) $120 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$

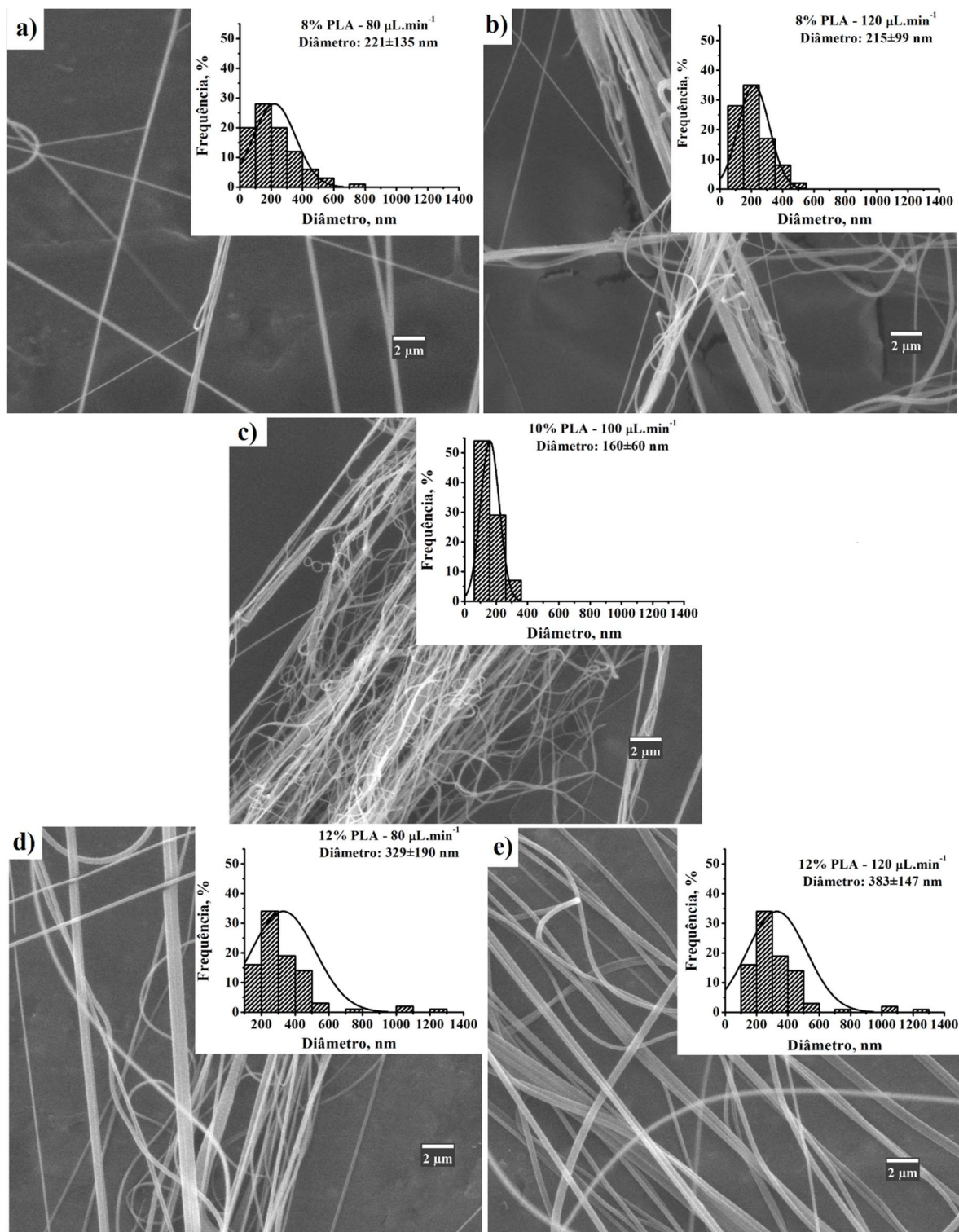
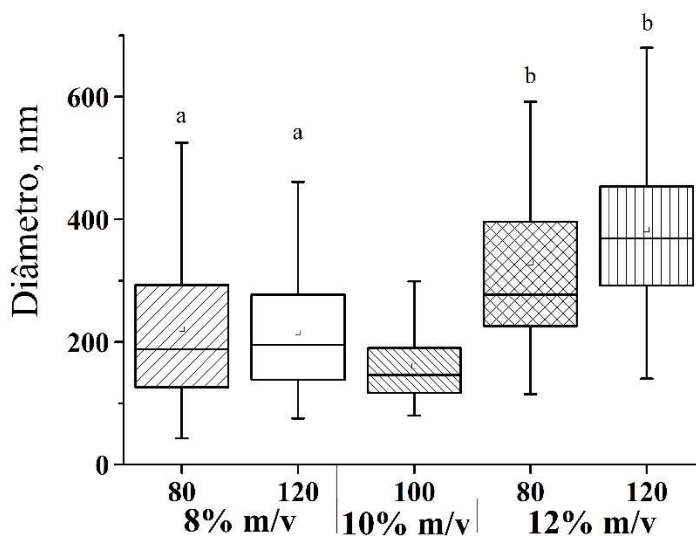


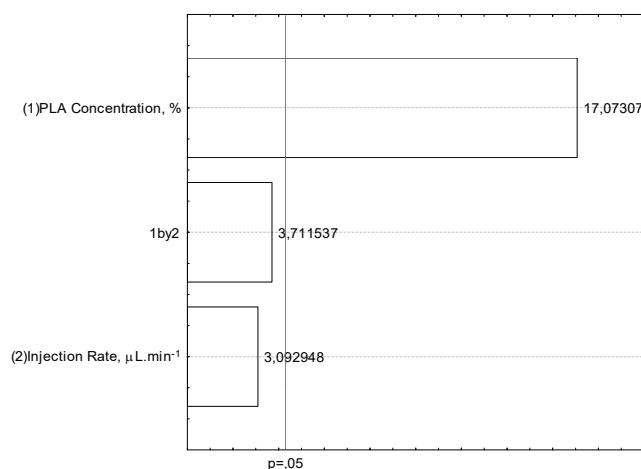
Figura 5-3. Diâmetro das fibras de PLA nas variáveis concentração e taxa de injeção

Letras sobrescritas idênticas denotam que não há diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn post hoc)

Através dos valores descritos nos histogramas, pode-se avaliar que os diâmetros dos experimentos não estão distribuídos de forma normal com uso do teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A Figura 5-3 mostra o *boxplot* de cada experimento em que se pode observar, com uso do teste Kruskal-Wallis, que as únicas comparações entre experimentos que não foram estatisticamente significativas foi quando para a mesma concentração houve taxas de injeção diferentes ($p > 0,05$), sugerindo que a esta variável não influencia os diâmetros das fibras para uma mesma concentração. As demais variações são estatisticamente significativas ($p < 0,01$), sugerindo que tanto a concentração quanto a taxa de injeção influenciam nos diâmetros das fibras.

A Figura 5-4 apresenta o diagrama de Pareto mostrando que apenas a concentração de PLA apresenta efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) sobre o diâmetro médio das fibras, ou seja, nem a taxa de injeção nem a interação entre os parâmetros têm influência sobre os resultados ($p > 0,05$). Oliveira *et al.* [57] e Parize *et al.* [165] compararam em seus trabalhos, além da concentração polimérica, a variação de pressão e a taxa de injeção, concluindo também que a concentração foi a variável mais significativa em relação ao aumento do diâmetro de fibra pelo SBS.

Figura 5-4. Diagrama de Pareto em relação aos parâmetros avaliados para a fiação das fibras de PLA



A variação de diâmetros dessas mantas foi ajustada para se obter os coeficientes de regressão seguindo a Equação 5-1:

$$D = d_o + d_1 C_{PLA} + d_2 v + d_3 C_{PLA} v \quad \text{Equação 5-1}$$

Tal que D é o diâmetro médio das fibras; d_i os coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados; C_{PLA} a concentração de PLA; e v a taxa de injeção. Os resultados obtidos se encontram na Tabela 5-4.

Tabela 5-4. Coeficientes do modelo de regressão linear proposto para o diâmetro médio das fibras

Fator	Coefficiente	Erro Puro	T	p
d_o	200,9	3,0	76,047	<0,001
d_1	-3,0	8,1	17,173	0,003
d_2	-3,1	8,1	3,093	0,09
d_3	3,8	8,1	3,712	0,06

Para se verificar o ajuste do modelo (Equação 5-1 com os resultados da Tabela 5-4) aos dados experimentais foi realizada análise de variância (ANOVA) da regressão através do coeficiente de correlação (R) e do teste F . A partir dos dados da Tabela 5-5, observa-se que a razão $F_{\text{calculado}}$ (Média Quadrática da Regressão / Média Quadrática dos

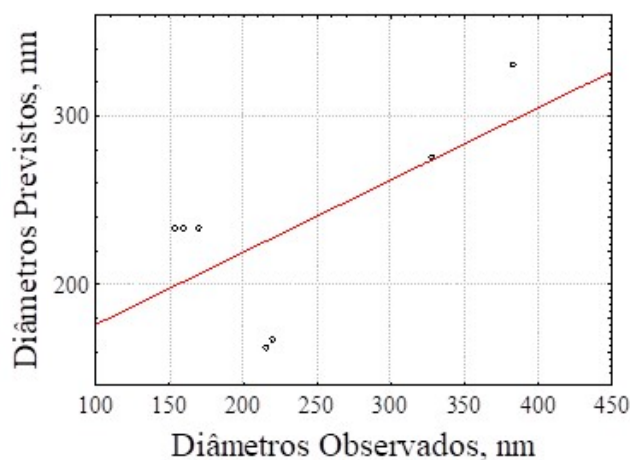
Resíduos) é cerca de 12 vezes menor do que o valor tabelado $F_{0,95;3;3}=9,28$; que a razão da Média Quadrática da Falta de Ajuste pela Média Quadrática do Erro Puro é vinte e duas vezes maior do que $F_{0,95;1;2}=18,51$; e que a porcentagem de variação explicada pelo modelo é de apenas 43% (razão entre a Soma Quadrática da Regressão pela Soma Quadrática do Total).

Tabela 5-5. ANOVA dos efeitos da concentração de PLA e da taxa de injeção no diâmetro das fibras de PLA

Fator	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F _{cal}	F _{tab}
Regressão	20569	3	6865	0,75	9,28
Resíduos	27419	3	9139		
Falta de Ajuste	27288	1	27287	417,64	18,51
Erro Puro	131	2	65		
Total	47988	6			

Desta forma, conclui-se que o modelo sugerido não consegue prever com precisão os diâmetros médios das fibras, cuja correlação entre o diâmetro previsto pelo diâmetro esperado chega à precisão de apenas 43%, logo o modelo não é preditivo. Isto é corroborado pela Figura 5-5 em que os pontos afastados da reta sugerem má qualidade de ajuste do modelo estatístico.

Figura 5-5. Valores previstos e observados para o diâmetro médio das fibras



Em suma, como a previsão do modelo matemático foi falho, tomou-se para o desenvolvimento das mantas de PLA contendo PEG e própolis vermelha, foram escolhidos a concentração de 12% de PLA com taxa de injeção de $120 \mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ por nestas condições se obter a menor quantidade de *beads*, maior densidade de fibras e orientação mais homogênea.

5.2.2 Mantas de PLA/PEG e PLA/PEG com PV

As fotografias macroscópicas das mantas de PLA/PEG sem e com PV se encontram no Apêndice (Figura A0-5 no Apêndice). A Figura 5-6 ilustra as micrografias das mantas de PLA/PEG sem e com PV. Todas as mantas apresentaram fibras lisas. Observa-se que a presença de PEG (Figura 5-6a-d) faz com que haja aumento dos diâmetros das fibras, sendo estatisticamente significativa comparando a 70PLA com 100PLA ($p < 0,01$), 90PLA ($p < 0,0001$) e 80PLA ($p < 0,01$) (Figura 5-7).

Entre as mantas incorporadas com 16% m/m de PV em relação à massa total dos polímeros (Figura 5-6e-f), visualiza-se fibras lisas sem formação de *beads* e cristais, como observado por Seif *et al.* [70]. As fibras com PV se tornaram mais finas com o aumento da concentração de PEG. Tem-se que a 100PLA.PV é estatisticamente significativa em termos de diâmetro da 90 PLA.PV ($p < 0,0001$), 80PLA.PV ($p < 0,05$) e 70PLA.PV ($p < 0,0001$) (Figura 5-6).

A comparação sem e com própolis mostra que as mantas 100PLA e 100PLA.PV, 90PLA e 90PLA.PV e 80PLA e 80PLA.PV possuem diâmetros significativamente diferentes com $p < 0,0001$, com exceção da 70PLA e 70PLA.PV, cujas medidas não possuem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 5-7).

O aumento dos diâmetros das fibras devido às blendas de PLA com polímeros hidrofílicos também foi retratado por Oliveira *et al.* [59], Nepomuceno *et al.* [163], Bonan *et al.* [64] e Chen *et al.* [196], corroborando com os resultados de nosso estudo. Ainda nestes trabalhos, observou-se que a adição dos princípios ativos, fez com que seus diâmetros aumentassem, comportamento contrário ao obtido com a PV, sugerindo uma maior interação intermolecular do PEG com a PV e a possibilidade de diferentes influências entre polímeros e fármacos no processo de fiação [61,70,197].

Figura 5-6. Micrografias das fibras de (a) 100 PLA (b) 90PLA (c) 80PLA (d) 70PLA (e) 100PLA.PV (f) 90PLA.PV (g) 80PLA.PV e (h) 70PLA.PV

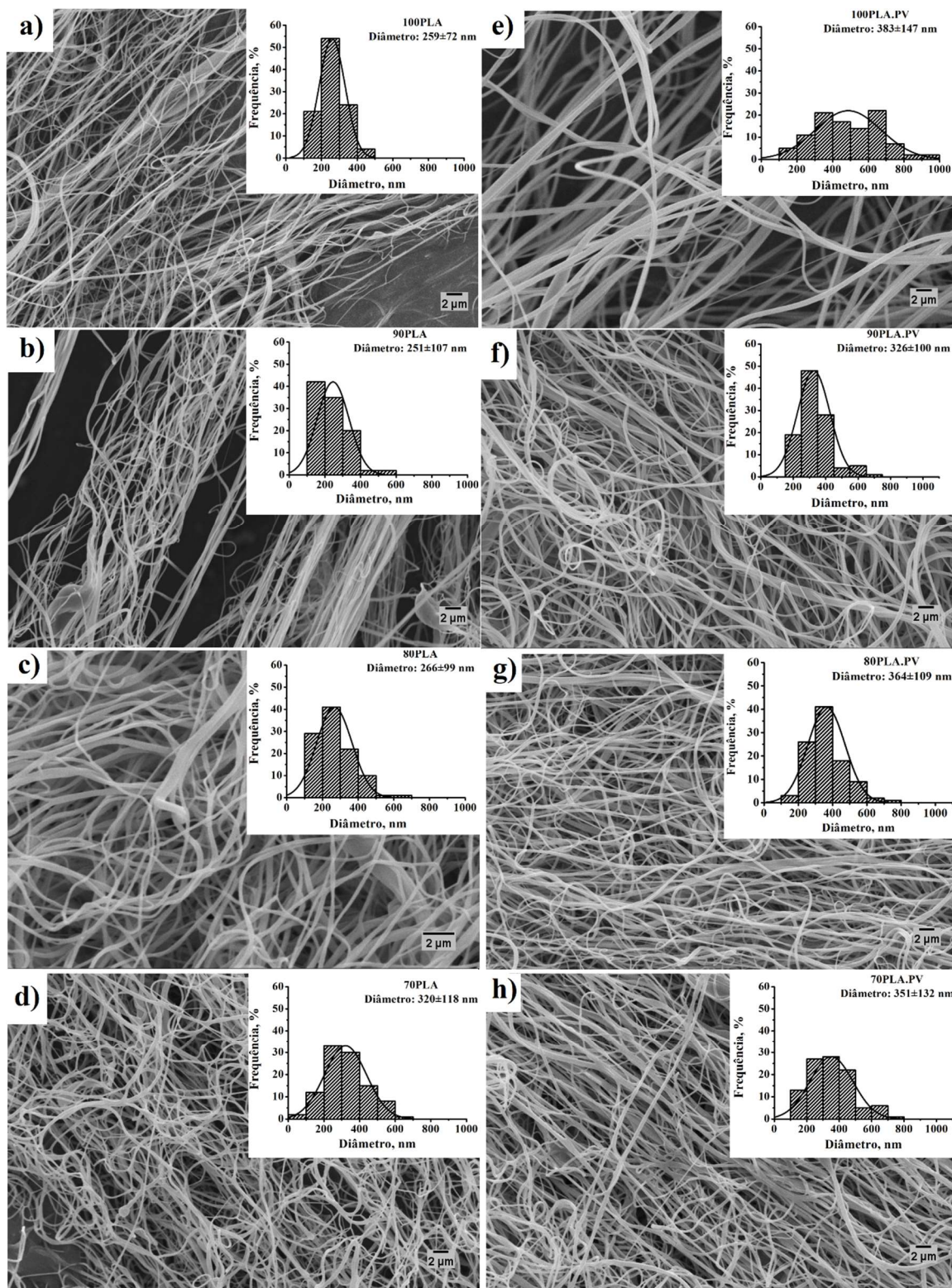
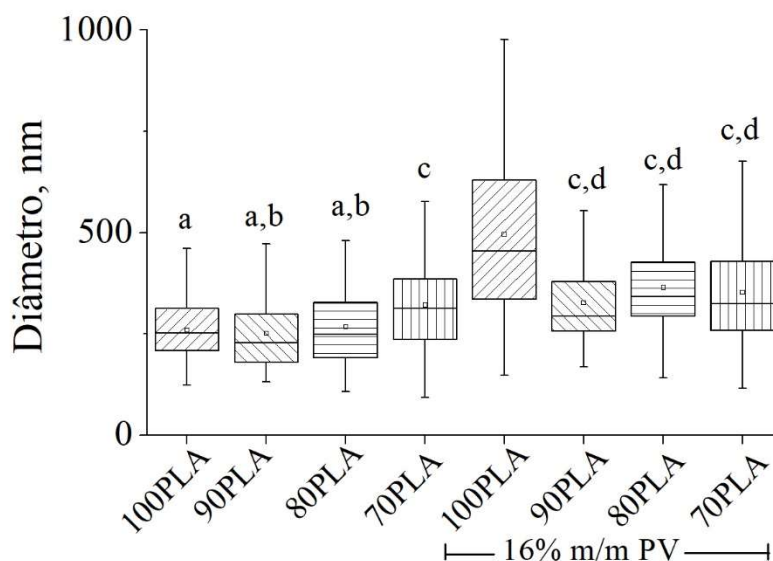


Figura 5-7. Diâmetros das mantas de PLA/PEG sem e com PV

Letras sobrescritas idênticas denotam que não há diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn post hoc)

5.2.3 *Infravermelho com Transformada de Fourier*

A Figura 5-8 mostra as absorções de infravermelho do PEG e das mantas de PLA/PEG.

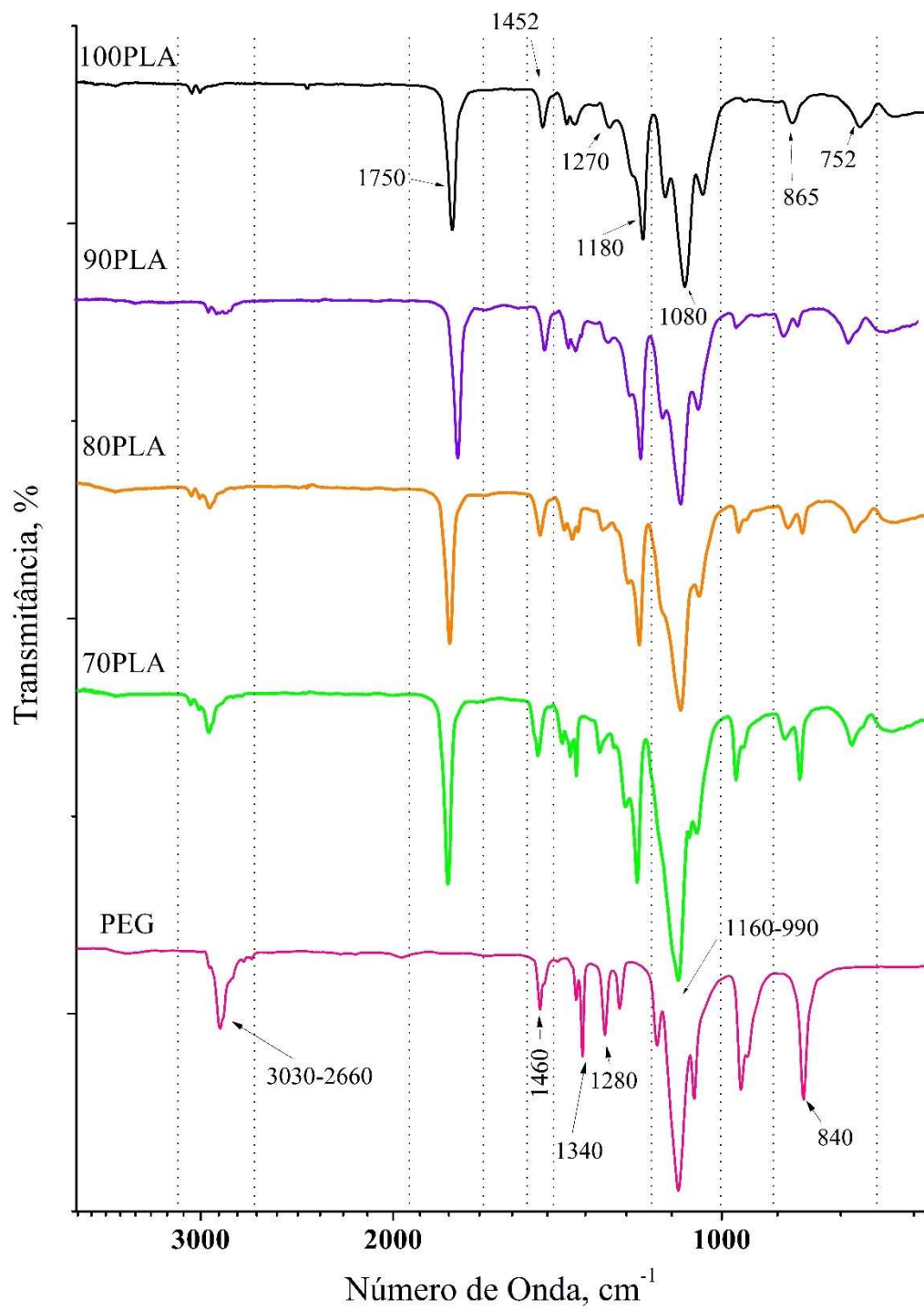
O PEG possui absorção na região de 3030 a 2660 cm^{-1} devido a estiramento -OH das hidroxilas terminais, assim como em 1340 cm^{-1} se tem sua deformação angular e em 1280 cm^{-1} o estiramento C-O de álcoois primários. Em 1460 cm^{-1} , há presença da deformação angular e em 840 cm^{-1} a deformação do tipo *rocking* C-H de metilenos. Na faixa de 1160 a 990 cm^{-1} as absorções são referentes ao estiramento C-O de éter.

Para as fibras, pode-se observar na 100PLA o estiramento de C=O de carbonila de éster em 1750 cm^{-1} ; 1270 , 1180 e 1080 cm^{-1} se referem aos estiramentos C(=O)-O, O-C-C e C-O, respectivamente. O pico em 1450 cm^{-1} se refere ao estiramento C-CH₃. Os picos em 865 e 752 cm^{-1} são descritos como as fases amorfa e cristalina do PLA [163,198].

Observa-se que para as blendas, as absorções C=O, C(=O)-O, O-C-C e C-O se mantém suas absorções nas faixas descritas para 100PLA. Contudo, quanto maior a concentração de PEG, mais intensas são estas absorções, principalmente para a manta 70PLA na faixa de 1160 e 1000 cm^{-1} , cuja sobreposição de picos se referem ao estiramento C-O tanto de éster (PLA) quanto de éter (PEG). As mantas 80PLA e 70PLA apresentam absorções na região de 3141 a 2624 cm^{-1} devido à deformação angular do

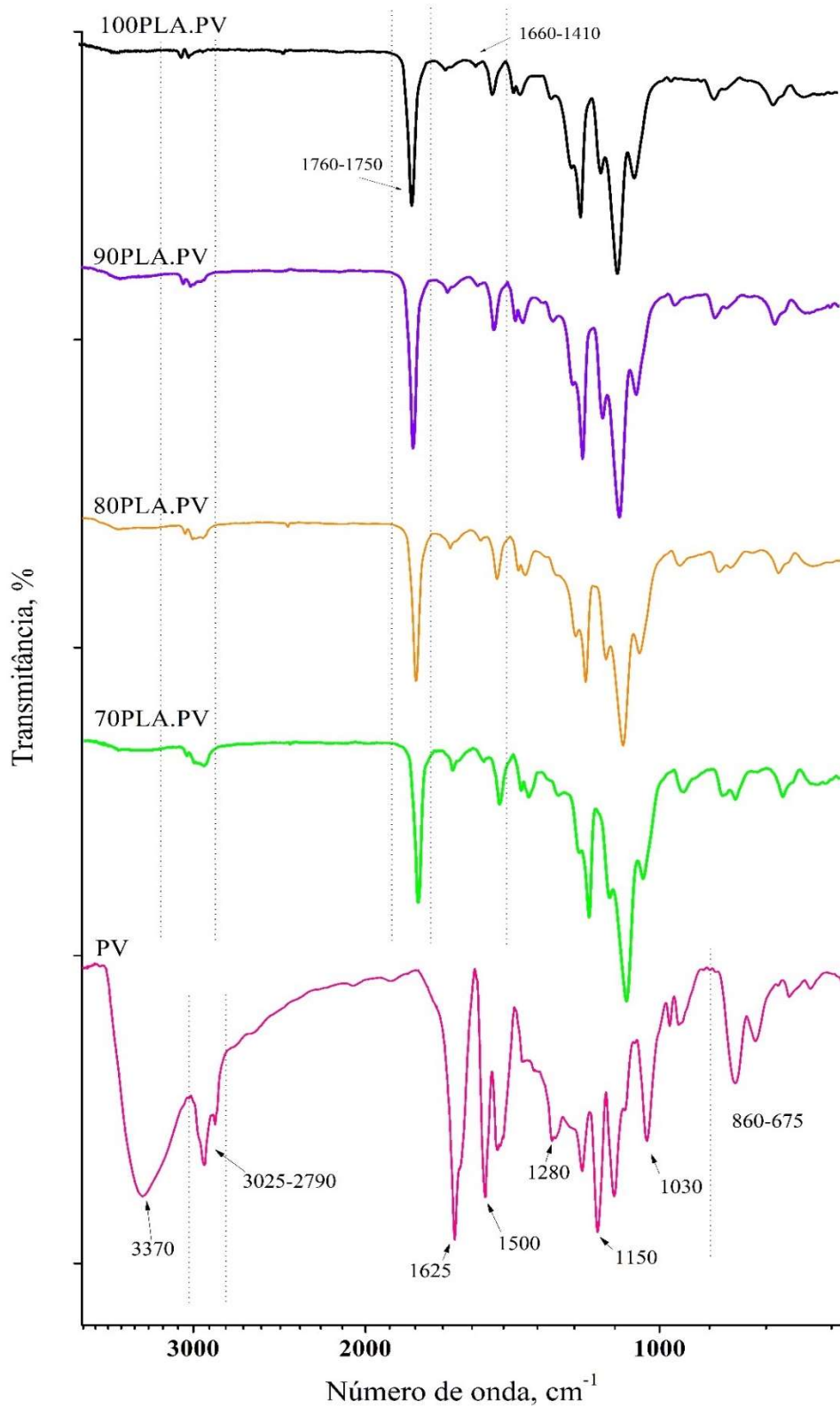
grupo O-H dos álcoois terminais do PEG, além de possuir com baixa intensidade picos em 1452 cm^{-1} referentes à deformação angular de CH_2 e em 840 cm^{-1} a deformação tipo *rocking*.

Figura 5-8. FTIR do PEG e das fibras de PLA/PEG



A Figura 5-9 mostra o espectro por FTIR da própolis vermelha e das fibras de PLA/PEG contendo 16% (m/m) PV.

Figura 5-9. Espectro de FTIR da própolis e das fibras de PLA/PEG com PV



O extrato de própolis apresenta absorções na faixa de 860 a 675 cm^{-1} referentes a torções fora do plano de ligações C-H de anéis aromáticos polinucleares, enquanto as torções no plano são encontradas em 1030 cm^{-1} . Estiramentos C-H de anéis podem ser encontrados na faixa de 3025 a 2790 cm^{-1} . Estiramentos C=C de anéis são encontrados em 1625 e 1500 cm^{-1} . Estiramento de C-O de fenóis pode ser encontrado no pico 1150 cm^{-1} . Os picos em 3370 e 1280 cm^{-1} se referem, respectivamente, ao estiramento intermolecular do hidrogênio com oxigênio e torções no plano de O-H de fenóis. Estas absorções ratificam que os flavonoides são os compostos majoritários da PV [199,200].

Ao se tratar das mantas contendo PV, verifica-se que as absorções C=O foram levemente deslocadas para a esquerda, na faixa de 1760 a 1750 cm^{-1} , as C(=O)-O, O-C-C e C-O referentes aos ésteres do PLA se mantiveram nos mesmos comprimentos de onda, contudo com intensidade mais baixas comparadas às fibras sem PV. Observou-se que as mantas de PLA/PEG com PV, apresentaram absorções nas regiões entre 1660 a 1410 cm^{-1} provenientes de estiramento C=C de anéis e na região de 3066 a 2700 cm^{-1} , torções no plano de O-H de fenóis. Ambas absorções estão associadas à compostos aromáticos, como flavonoides, contidos na PV [201].

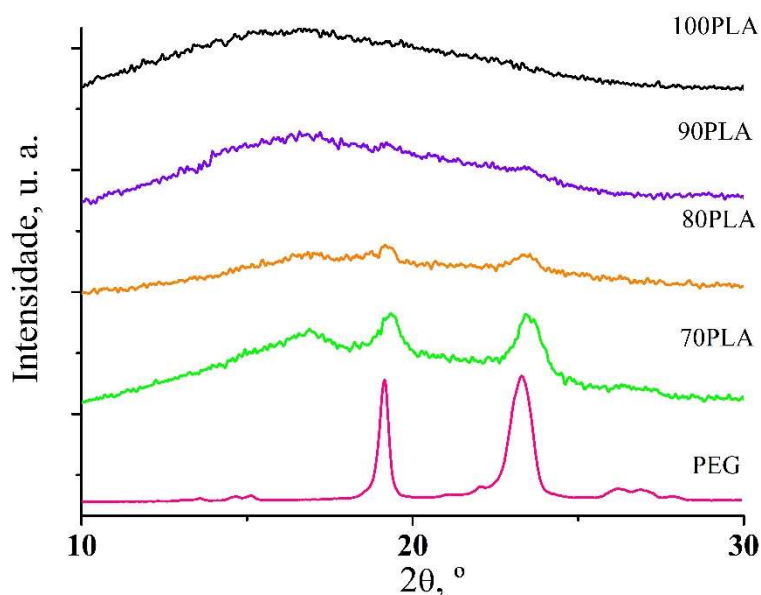
Portanto, estas absorções comprovam a presença de PV nas mantas sem modificar quimicamente as fibras de PLA/PEG, descritas na Figura 5-7.

5.2.4 Difração de Raio X

A Figura 5-10 apresenta os padrões de difração de raios X do PEG e das fibras de PLA/PEG. Como pode ser visto, a fibra 100PLA mostra um halo difratométrico que indica que a fibra de PLA possui forma amorfa. Em relação ao pó do PEG, verifica-se dois picos agudos em $2\theta=19,2^\circ$ e $2\theta=23,3^\circ$, além de outros picos fracos entre $2\theta=25,7-28,0^\circ$, que indicam que o PEG possui uma estrutura cristalina bem definida. Segundo Morris *et al.* [202], o poli(etileno glicol) possui a conformação helicoidal dentro de uma célula unitária monoclinica de dimensões $a=8,16 \text{ \AA}$, $b=12,99 \text{ \AA}$ e $c=19,30 \text{ \AA}$.

O DRX das blendas, mostra que para 90PLA há presença de um pico amplo em $2\theta=16,5^\circ$. Para 80 PLA, existem dois picos discretos em $2\theta=19,2^\circ$ e $2\theta=23,4^\circ$. 70PLA possui três picos razoavelmente mais proeminentes em $2\theta=16,9^\circ$, $2\theta=19,3^\circ$ e $2\theta=23,4^\circ$.

Figura 5-10. Padrões de DRX para o PEG e as fibras de PLA/PEG

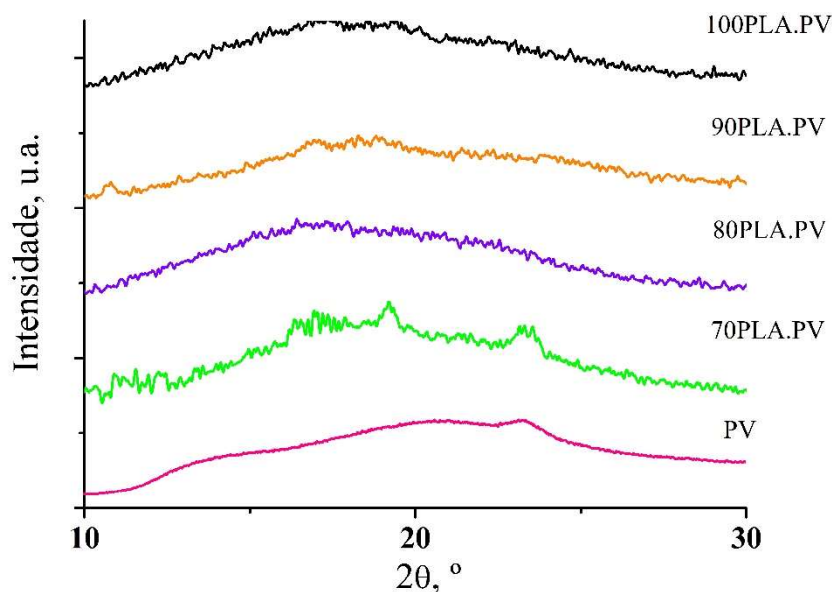


Logo, os padrões difratométricos das blendas vai se alterando pelo aparecimento dos picos quando a proporção de PEG aumenta, demonstrando que a fração cristalina das fibras aumenta com a presença do PEG. Como também se observa que 100PLA e 90PLA são cristalograficamente similares, assim como 80PLA e 70PLA tende a se parecer mais com o PEG.

Comportamentos similares para o PLA foi encontrado em Parize *et al.* [165] e Perumal *et al.* [84]; e do PEG, por Oliveira *et al.* [204], em que as fibras de PEO fiadas pelo SBS apresentaram mais picos do que as obtidas pela eletrofição.

Os padrões de DRX da própolis e das mantas de PLA/PEG com PV estão delineadas na Figura 5-11. A manta 100PLA.PV apresenta um amplo pico em $2\theta=17,0^\circ$ idem 90PLA.PV e 80PLA.PV, revelando-se como um material de característica amorfa. Enquanto o 70PLA.PV além de mostrar um pico largo em aproximadamente $2\theta=17,1^\circ$ referente ao PLA, também exibe picos discretos em $2\theta=19,1^\circ$ e $2\theta=23,1^\circ$, tendendo a se tornar parecido com o PEG puro. A própolis vermelha apresenta um pico largo em aproximadamente $2\theta=21,7^\circ$ expondo seu padrão amorfo.

Desta forma, verificou-se que pela PV ser predominantemente amorfa esta característica foi transferida para as todas as mantas, principalmente as 80PLA.PV e 70PLA.PV, uma vez que suas correspondentes sem própolis apresentaram frações cristalinas devido à quantidade de PEG.

Figura 5-11. DRX da própolis e das fibras de PLA/PEG com PV

Em sistemas biológicos, a cristalinidade do material está associada a proliferação celular, cujo comportamento é o mais desejável em *scaffolds* para regeneração de tecidos e aumento da sua estabilidade no organismo. Tohamy *et al.* [205], desenvolveram filmes de PCL/PGA em diferentes proporções e, conseqüentemente, diferentes frações cristalinas. Observou-se que fibroblastos NIH 3T3 aderiram e se proliferaram melhor nas superfícies mais cristalinas, enquanto a densidade de pré-osteoblastos foi maior nas condições amorfas, demonstrando que a cristalinidade pode induzir o crescimento de células variadas.

5.2.5 Termogravimetria

A análise termogravimétrica (TGA) em função da temperatura pode revelar a estabilidade ou resistência térmica de um material através de suas variações de massa em condições controladas de temperatura e atmosfera. Logo, tem-se que T_{onset} é medida através da extrapolação linear da curva de TGA, correspondendo à temperatura em que se inicia a degradação térmica e T_{pico} como o pico da primeira derivada da curva termogravimétrica (DTG), indicando a temperatura em que o evento térmico está em sua taxa máxima [165,206,207].

A Figura 5-12 apresenta as curvas TGA e DTG do PEG e das mantas de PLA e PLA/PEG e na Tabela 5-6, suas respectivas temperaturas em que ocorreram as perdas de

massa. Observa-se que o PEG possui elevada resistência térmica com degradação em uma etapa referente a formação de hidroperóxidos que, em seguida, são decompostos por radicais livres nos oxigênios das cadeias carbônicas e hidroxilas formando ésteres fórmicos, que sofrem cisão para término da degradação [208–210].

Dentre as mantas, a 100PLA possui a maior resistência térmica, apresentando T_{onset} e T_{pico} em 284 °C e 374 °C, respectivamente, com perda de massa em uma única etapa devido à transesterificação intramolecular, pirólise dos ésteres e cisão das cadeias carbônicas [211,212].

Figura 5-12. Curvas TG e DTG do PEG e das fibras PLA/PEG

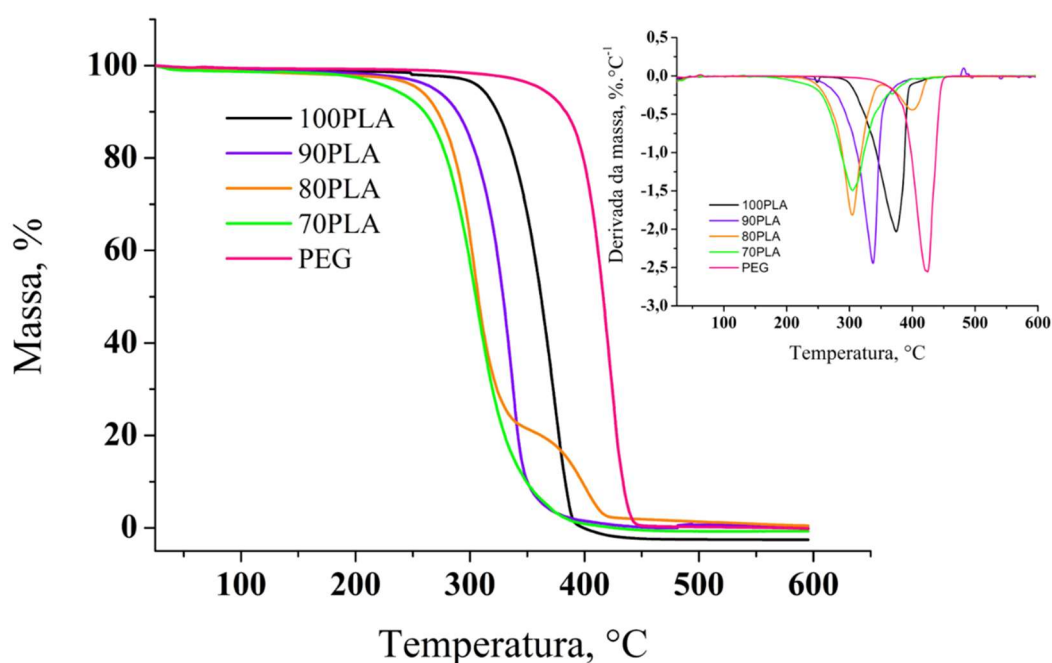


Tabela 5-6. T_{onset} , T_{pico} e perda de massa ds mantas PLA/PEG

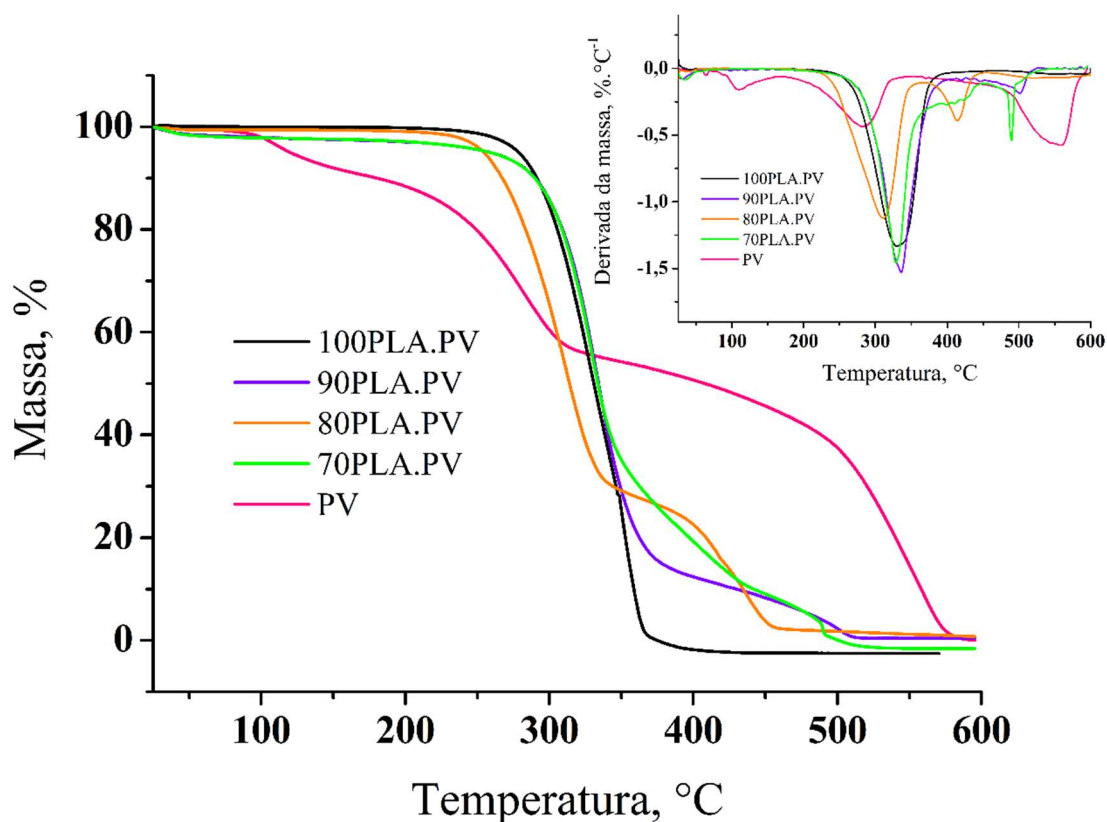
Amostra	Etapa	T_{onset} , °C	T_{pico} , °C	Massa, %
100PLA	1 ^a	331	374	100
90PLA	1 ^a	298	336	100
80PLA	1 ^a	279	337	77,6
	2 ^a	330	411	22,4
70PLA	1 ^a	271	306	100
PEG	1 ^a	396	424	100

Em relação às fibras de PLA com PEG, pode-se observar que o aumento na concentração de PEG tornou as mantas menos estáveis termicamente com perda de massa em um único evento na faixa de 271 a 298 °C para T_{onset} , cujo evento pode ser atribuído à transesterificação inter e intramolecular referente ao PLA, formação de radicais livres e cisões na cadeia carbônica de forma sinérgica e uniforme proveniente do PEG.

Contudo, a fibra 80PLA teve duas etapas de degradação térmica, sendo a T_{onset} do primeiro evento associada à degradação do PLA e o segundo, a do PEG, como se pode observar pela DTG. Isto pode ser um indicativo de que nesta proporção, o PLA e o PEG estejam em uma concentração crítica, ou seja, o emaranhamento entre suas cadeias não tenha sido eficaz, formando fases à nível molecular e mostrando termicamente o comportamento individual de cada componente. Resultados similares foram encontrados nos trabalhos de Ozdemir *et al.* [213,214], cuja análise de corrente total de íons (*Total Ion Current*, em inglês), em condições de pirólise, mostra que na blenda de PLA com 15% de PEG há o início da formação de ésteres provenientes da interação COOH do PLA e com C-O-C do PEG. Com o aumento da concentração deste plastificante houve a tendência de se formar um único pico, sugerindo que houve esterificação entre os polímeros. Outra possibilidade pode estar associada ao perfil cristalográfico, uma vez que na concentração 80PLA, há aumento da fração cristalina das mantas em comparação com as 100 e 90PLA (Figura 5-10).

Comparando-se as mantas com o PEG, esperava-se que as fibras 90, 80 e 70 PLA fossem apresentar estabilidades térmicas superiores às 100PLA, já que o PEG é termicamente mais estável, porém o contrário que foi observado. Então, acredita-se que os fatores proeminentes para tal resultado sejam a cristalinidade do PEG, uma vez que a análise foi realizada com ele em pó [215,216]; a elevada área superficial das mantas produzidas por SBS, também podendo diminuir a cristalinidade dos polímeros [165]. Logo, observou-se que a adição de PEG tende a interferir nas estabilidades térmicas das mantas de forma inversamente proporcional.

A Figura 5-13 e a Tabela 5-7 mostram as TG, DTG e as temperaturas em que ocorrem as perdas de massa das mantas com PV e da própria própolis.

Figura 5-13. Curvas TG e DTG do PV e das fibras PLA/PEG com PV**Tabela 5-7.** T_{onset} , T_{pico} e perda de massa ds mantas PLA/PEG com PV

Amostra	Etapa	T_{onset} , °C	T_{pico} , °C	Massa, %
100PLA.PV	1 ^a	289	334	100
90PLA.PV	1 ^a	299	334	84,4
	2 ^a	490	501	15,6
80PLA.PV	1 ^a	270	307	70,3
	2 ^a	399	416	29,7
70PLA.PV	1 ^a	300	329	61,0
	2 ^a	348	418	31,3
	3 ^a	487	490	7,7
PV	1 ^a	61	64	1,0
	2 ^a	94	113	4,8
	3 ^a	228	281	37,8
	4 ^a	305	557	56,4

A própolis vermelha por ser composta por uma variedade de componentes apresentou quatro etapas de perda de massa: a primeira, pode ser atribuída aos monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos com até 10 carbonos, correspondendo aos compostos voláteis da própolis responsáveis pelo seu aroma ($T_{\text{onset}} = 61\text{ }^{\circ}\text{C}$) [217–220]; a segunda ($T_{\text{onset}} = 94\text{ }^{\circ}\text{C}$), corresponde à volatilização de etanol residual durante o preparo do extrato, assim como de umidade e outros voláteis de baixa massa molar [200]; a terceira ($T_{\text{onset}} = 228\text{ }^{\circ}\text{C}$), devido à condensação de grupos -OH, quebra das cadeias carbônicas do ácido cafeico, p-cumárico e flavonoides por suas degradações se iniciarem aproximadamente em 170–246°C [221,222]; e a quarta, provavelmente à decomposição e combustão de ceras, resinas (hidrocarbonetos com 15 ou mais carbonos) [18] e impurezas [223]. Resultado similar também foi encontrado por Costa [224].

As mantas contendo PV apresentaram dois ou três eventos térmicos, com exceção da 100PLA.PV, que apresentou um. Logo, a primeira etapa de perda de massa para todas as fibras está associada à degradação do PLA através de reações intra e intermoleculares de transesterificação e cisões das cadeias poliméricas, assim como reações de condensação de hidroxilas referentes aos voláteis, ácidos e flavonoides da própolis. O segundo evento térmico para a 90PLA.PV corresponde à resquícios de ceras e resinas da PV, como se pode ser pela DTG; já para 80 e 70PLA.PV, trata-se da concentração crítica do polímero com oligômero e a PV, fazendo com que o PEG se degrade em uma temperatura diferente do PLA. O terceiro estágio acontece somente para a 70PLA.PV estando associada à combustão de ceras e resinas.

Desta forma, observa-se que a adição de PV às mantas promoveu diminuição da estabilidade térmica e aumento na quantidade de eventos devido à complexa composição deste extrato que abrange desde moléculas voláteis, que por possuírem baixa massa molar se degradam mais rapidamente, até ceras, que geralmente são hidrocarbonetos de alta massa molar e possuem maior resistência térmica.

5.2.6 Ângulo de contato estático com água

A molhabilidade dos materiais relaciona interações intermoleculares superficiais de seus componentes quando em contato com uma gota de algum líquido (água, óleo, PBS, etc.) em meio a uma atmosfera (ar, O₂, N₂, etc.) indicando suas tendências de

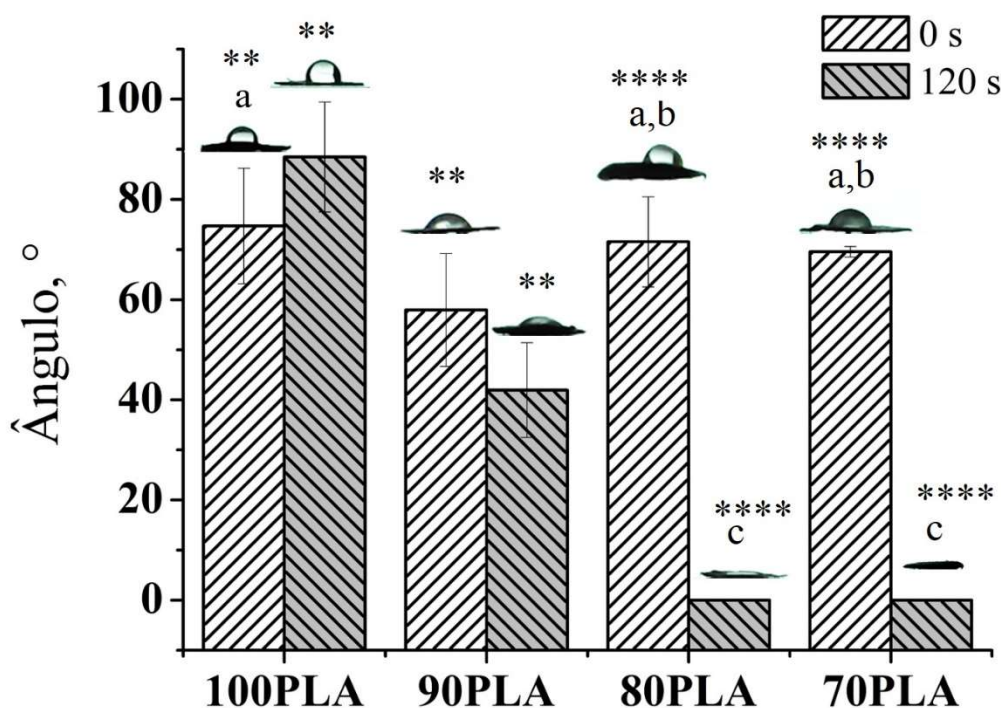
afinidade química a substâncias polares (hidrofilicidade) ou apolares (hidrofobicidade) [225–227].

Em $t=0$ s, a Figura 5-14 mostra que o ângulo de contato das fibras diminuiu com o aumento da concentração de PEG, ou seja, o PEG melhorou a hidrofilicidade das mantas. Excepcionalmente, o menor ângulo foi apresentado pela 90PLA ($p<0,05$).

Para $t=120$ s, a hidrofilicidade foi crescente para $100\text{PLA} < 90\text{PLA} < 80\text{PLA} = 70\text{PLA}$, as comparações apresentaram diferença estatística de $p<0,0001$.

Comparando 100PLA em $t=0$ s e $t=120$ s, obteve-se $p<0,001$, também encontrado para 90PLA. Para 80PLA e 70PLA, esse valor foi de $p<0,0001$.

Figura 5-14. Ângulos de contato das fibras de PLA/PEG



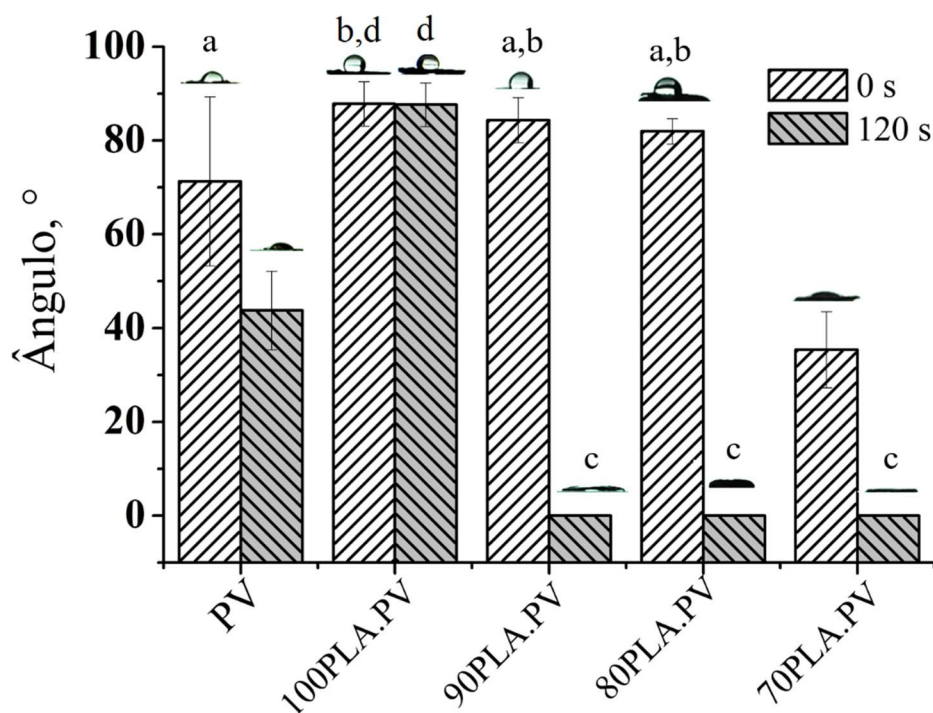
Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão ($n=6$). As letras idênticas denotam que não há diferença significativa entre os grupos ($p<0,05$ quando diferentes de “a” e “b” para $t=0$ s; e $p<0,0001$, para “c” quando $t=120$ s). Os asteriscos denotam diferença estatística entre os tempos $t=0$ s e $t=120$ s (** $p<0,01$ e **** $p<0,0001$). Em ambas situações, aplicou-se o teste de Tukey.

Constata-se na Figura 5-15 que o extrato etanólico da própolis vermelha apresenta hidrofobicidade em um primeiro instante, provavelmente relacionada às suas ceras, mas em 120 s ($p<0,0001$) há diminuição no seu ângulo de contato proporcionado pela

solubilização de alguns flavonoides mais polares, confirmando a natureza de a própolis ser parcialmente solúvel em meio aquoso [228–231].

Desta forma, verifica-se que a própolis eleva a hidrofobicidade das mantas em comparação com as sem fármaco ($p > 0,05$), com exceção da 70PLA.PV ($p < 0,01$), em um primeiro contato. Provavelmente, por nesta condição, haver PEG em excesso fazendo com os pares de elétrons livres do oxigênio deste polímero interajam mais fortemente com as ligações -OH dos flavonoides e da água por pontes de hidrogênio, diminuindo consideravelmente a hidrofobicidade das mantas de PLA. Enquanto nas demais proporções, a disponibilidade de elétrons livres do PEG atue prioritariamente com os componentes da própolis, diminuindo, assim, a hidrofiliidade das fibras em comparação às puras. Contudo, o tempo de absorção da gota nas mantas 90 e 80 PLA.PV foi inferior a 120 s e proporcional à quantidade de PEG na blenda, fazendo com que a fibra 90PLA.PV se tornasse mais hidrofílica do que a 90PLA.

Figura 5-15. Ângulos de contato das fibras de PLA/PEG com PV



Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão ($n=6$). As letras idênticas denotam que não há diferença significativa entre os grupos ($t=0s$: $p < 0,05$ quando diferentes de “a” e $p < 0,001$ para “b”; $t=120s$, $p < 0,0001$ para “c”; e “d” para $p < 0,05$ para se comparar $t=0s$ com $t=120s$). O teste de Tukey foi aplicado nestas situações.

Comparando-se $t=0s$ com $t=120s$, tem-se que não há diferença estatística para 100PLA.PV. Para as demais fibras, o tempo influenciou significativamente a molhabilidades ($p<0,0001$).

Observa-se também que o aumento da hidrofilicidade foi proporcional à concentração de PEG nas mantas para $t=120s$. Portanto, como esperado, o PLA apresentou hidrofobicidade intrínseca e o PEG, por ser solúvel em água, melhorou consideravelmente a hidrofilicidade das mantas, cuja característica é interessante para aplicação em células vivas por elevar sua adesão e proliferação celular [84,232,233].

5.2.7 Adsorção na superfície e eficiência de encapsulação

Dependendo das interações polímeros-solvente-fármaco devido ao emaranhamento entre as cadeias carbônicas e seus limites de solubilidade [197], o princípio ativo pode estar uniformemente distribuído nas fibras [234]; totalmente dentro e/ou fora das fibras, quando há fiação por *core-shell* [235]; ou adsorvido/cristalizado na superfície das fibras devido à baixa solubilidade do fármaco em relação aos polímeros e solventes [70]. Desta forma, para quantificar a adsorção/cristalização e incorporação de ativos, utilizam-se solventes a fins com o fármaco, mas que não solubilizem o polímero.

A Tabela 5-8 descreve o quanto de própolis vermelha está adsorvida na fibra de PLA/PEG, assim como sua eficiência de encapsulação nas fibras. Observa-se que o aumento da concentração de PEG faz com que haja aumento de PV adsorvido na superfície das fibras e, conseqüente, diminuição de extrato incorporado na fibra.

Tabela 5-8. Concentração de PV adsorvido na superfície (AS) da fibra e a eficiência de encapsulação (EE)

	AS, %	EE, %
100PLA	$0,03 \pm 0,01^a$	$99,8 \pm 0,1^c$
90PLA	$1,98 \pm 0,18^{a,b}$	$98,0 \pm 0,2^{c,d}$
80PLA	$3,47 \pm 0,78^b$	$96,5 \pm 0,8^d$
70PLA	$6,67 \pm 1,31$	$93,3 \pm 1,3$

Letras sobrescritas idênticas denotam que não há diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$) (Teste de Tukey).

Este comportamento já era esperado, uma vez que o PEG aumenta a molhabilidade de formulações, principalmente de compostos hidrofóbicos, como é o caso, para que haja melhor interação deste com meios hidrofílicos. Também se verifica que mesmo com uma porção de PV adsorvida, a maior parte dela ainda está incorporada na fibra. Estes parâmetros são importantes para avaliar se o dispositivo é adequado para uma determinada liberação devido à dose terapêutica disponível [236].

Wang *et al.* [173] reportam que a curcumina incorporada em fibras de zeína atingiu incorporações entre 96,9-98,7%. Moomand e Lim [236] e Neo *et al.* [237] também obtiveram encapsulações superiores a 95% com fibras de zeína incorporando óleo de peixe e ácido gálico. Roussaki *et al.* [238] desenvolveram nanopartículas de PLA com auricedina com encapsulação de 68-98%, cujas maiores eficiências foram observadas quando as interações entre a matriz e o fármaco se elevaram. Estas comparações mostram que as fibras de PLA/PEG podem ser usadas como encapsulantes eficazes para a PV.

5.2.8 Perfil de liberação *in vitro*

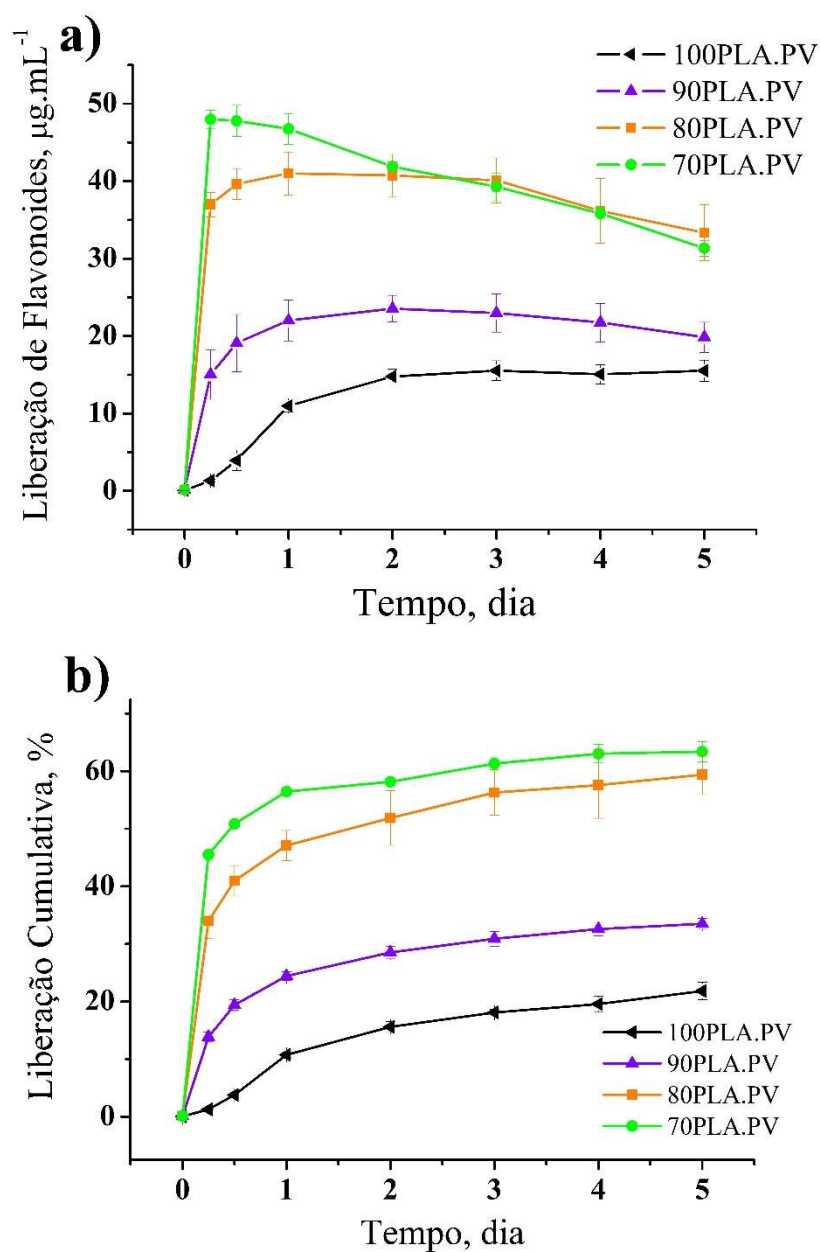
Os perfis de liberação do extrato de PV nas fibras de PLA-PEG foram avaliados *in vitro* em função do tempo. Na tentativa de ajustar as condições da liberação às condições fisiológicas, a temperatura (37 °C) e o PBS foram escolhidos para simular o fluido sanguíneo e as trocas das alíquotas de PBS, a entrada e a saída de fluidos do organismo. O método de quantificação de flavonoides totais por dissolução ($\lambda = 280$ nm) foi a metodologia escolhida para a quantificação de PV liberada. Os resultados de 5 dias de liberação são mostrados na Figura 5-15.

A Figura 5-16a mostra a quantificação direta dos flavonoides de PV liberados, considerando-se a capacidade de a fibra reter/liberar controladamente o princípio ativo através das interações polímeros-solvente-fármaco. Através desta visão, é possível sugerir trocas de curativo, em caso de aplicações em feridas, quando ocorre o declínio das concentrações, ou seja, quando a concentração do fármaco deixa de ficar constante.

Neste contexto, as mantas 100, 90 e 80 PLA.PV apresentaram três etapas de liberação: a primeira em que se atinge liberação rápida (*burst release*, do inglês), seguido de uma concentração constante com a variação do tempo e declínio na concentração. A 100PLA.PV atinge concentração máxima de $14,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 2 dias, mantendo a liberação estável até o 5º. Para a 90PLA.PV, o pico atinge o auge em 24h com concentração de $22,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a partir do 4º dia se inicia o declínio na liberação. A

80PLA.PV atinge concentração máxima de $41,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ também em 24h, mas decresce sua liberação no 3º dia. A manta 70PLA.PV possui duas etapas de liberação: a primeira se refere ao ápice de liberação com concentração de $47,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em 6h; e a segunda com declínio de concentração em menos de 12h.

Figura 5-16. Liberação controlada da PV nas fibras de PLA em função do tempo (a) por dissolução e (b) cumulativo



Através destes dados, nota-se que a concentração de PEG influencia diretamente a liberação de própolis, ou seja, quanto maior a concentração de PEG na manta, mais extrato é liberado, no que se refere à concentração máxima. Isto ocorre porque o PEG, como agente molhante, é amplamente empregado na indústria alimentícia e farmacêutica com a finalidade de aumentar a afinidade de substâncias hidrofóbicas em meios hidrofílicos [103,105], uma vez que cada monômero de PEG pode estar associada a duas ou três moléculas de água. Estas ligações fazem com que substâncias apolares que tenham afinidade com o PEG possuam sua solubilidade aumentada em até 10 vezes em relação às proteínas isoladas [104]. Como o extrato de própolis vermelha é parcialmente hidrofóbico, pode-se verificar que o PEG elevou sua solubilidade em mais de 30 vezes, considerando a liberação de 6h, em que a 100PLA.PV liberou $1,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a 70PLA.PV, $47,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Em relação à estabilidade da liberação, observa-se que o PEG teve efeito antagônico, uma vez que o crescimento de até 20% (m/m) deste oligômero fez com que as fibras diminuíssem em um dia seu controle de manter a concentração fixa em função do tempo. Com 30% (m/m), nem houve uma concentração constante.

Provavelmente, isto aconteça devido à distribuição de PV na fibra. Acredita-se, através dos dados da liberação com os da Tabela 5-5 sobre a proporção de PV adsorvida na superfície da fibra, que com até 20% (m/m) de PEG. Para 70PLA.PV, observa-se que há cerca de 6% (m/m) de PV adsorvida na superfície (Tabela 5-5) e falta de estabilidade na concentração, o que pode indicar que nesta fibra a maior parte do PEG pode estar concentrada na superfície das fibras junto com os flavonoides da PV através de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxilas (OH^-) e ($=\text{O}$) de cetonas e éteres das duas substâncias, enquanto que outros compostos da própolis se encontram mais próximos do núcleo com o PLA.

A tendência à migração do PEG foi reportado por Oliveira *et al.* [59]. Neste artigo, PLA/PEO foram fiados em diferentes proporções no SBS. Foi visto pela microscopia eletrônica de transmissão, que o PEO ficou na superfície das fibras quando a concentração deste superou 50% em relação ao PLA. Provavelmente, este comportamento pode ser justificado por esses polímeros possuírem comportamentos imiscíveis [59,163] devido aos seus parâmetros de solubilidade parciais serem relativamente distantes [239–241], ou seja, diminuindo a afinidade entre os polímeros.

O solvente também pode estar relacionado à adsorção de fármacos próximo à superfície das fibras, como relatada por Seif *et al.* [70]. O ácido cafeico (solúvel em água)

foi completamente liberado em PBS por estar adsorvido sobre fibras a ponto de ser distinguido no MEV por formar fase na superfície da manta. Alterações nos parâmetros de fiação foram feitas, contudo a heterogeneidade foi repetida/mantida. Misturas de 2,2,2-trifluoroetanol e dimetilformamida fez com que seu fármaco fosse incorporado nas fibras e sua liberação mantida estável em função do tempo.

Então, supondo do ponto de vista do solvente, ainda na solução polimérica, o DMC por ter mais afinidade química com o PLA, faz com que este se emaranhe até certo ponto com o PEG (até 20%). Porém, devido à força de interação entre PLA-DMC ser mais forte, o PEG tende a ir para a periferia com o aumento de sua concentração, levando consigo os flavonoides da PV. Após a fiação, o PEG da manta por ter afinidade com água foi solubilizado pelo PBS, promovendo a saída da PV da manta para o meio.

A Figura 5-16b mostra o saldo cumulativo de PV liberado das mantas em que se ratifica a proporcionalidade de liberação entre PEG e PV e se observa que nenhuma fibra atingiu liberação de 100%, provavelmente devido ao caráter hidrofóbico dos componentes da própolis impedindo sua solubilização completa no PBS [18]. Observa-se ainda, ao aplicar a ANOVA em cada tempo, que em 6h todas as liberações são significativamente diferentes ($p < 0,0001$). As mantas 100 e 90PLA.PV perdem a significância estatística ($p > 0,05$) no 5º dia de liberação. Já as mantas 80 e 70PLA.PV se tornam significativamente parecidas ($p > 0,05$) a partir do 2º dia. As demais comparações são estatisticamente diferentes com $p < 0,001$, no mínimo.

Portanto, nota-se que em termos de liberação as mantas 100, 90 e 80PLA.PV possuem a capacidade de manter as concentrações constantes até certo período de tempo; que o PEG eleva a quantidade de PV no meio de forma proporcional e que as fibras 100 e 90PLA.PV são estatisticamente similares a partir do 5º dia de liberação e que as 80 e 70PLA.PV possuem concentrações próximas a partir do 2º dia.

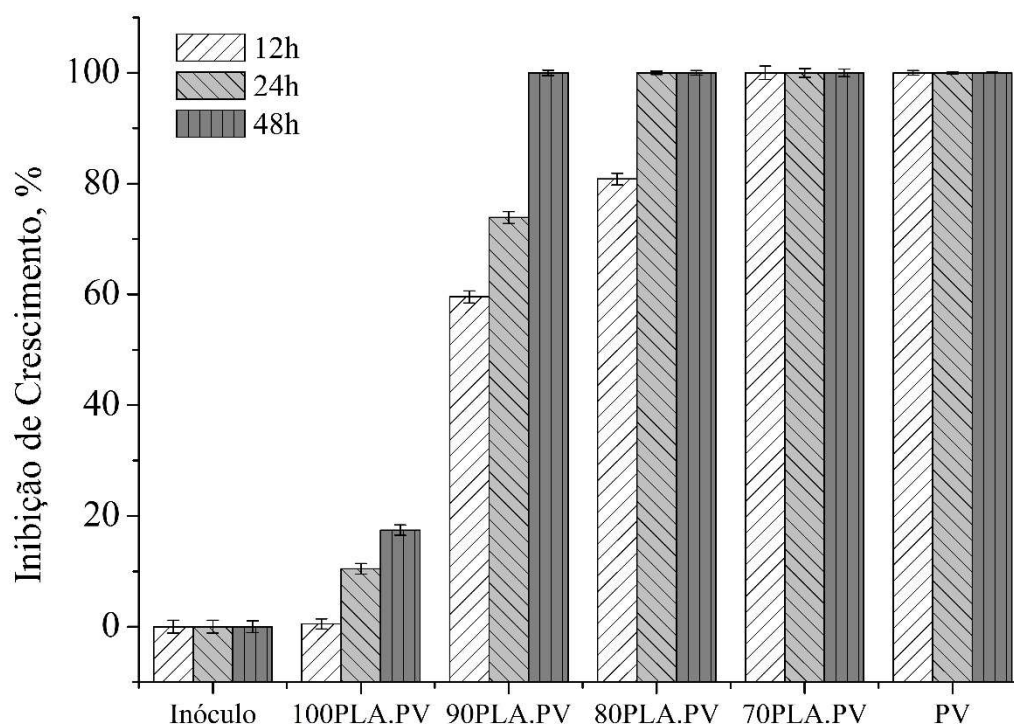
5.2.9 Cinética de inibição de *Staplylococcus aureus*

O *S. aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que se encontra naturalmente nos seres humanos, principalmente na pele e nas fossas nasais. Contudo, pode promover uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia quando em feridas. Este micro-organismo possui alta capacidade de adaptação e resistência, sendo de grande importância entre as infecções hospitalares [242–244].

A Figura 5-17 revela que a manta 70PLA.PV em 12h já inibe completamente o crescimento da *S. aureus*. Observa-se também que as mantas 80PLA.PV e 90PLA.PV inibiram por completo a partir da 24^a e 48^a hora, respectivamente. Enquanto a 100PLA.PV teve baixa inibição durante os três dias de incubação. Estes resultados estão diretamente ligados e corroborados ao tipo de liberação que cada fibra possui, uma vez que a 70PLA.PV libera mais rapidamente do que a de 100PLA.PV devido à sua afinidade com meio de cultura que é aquoso. As imagens das unidades formadoras de colônias estão expostas no Apêndice (Figura A0-5).

O inóculo e a própolis vermelha foram utilizados como controle positivo e negativo de crescimento da *S. aureus*. As mantas de PLA/PEG puras também foram ensaiadas sem inibir o crescimento destes micro-organismos, mostrando que os polímeros não possuem ação antimicrobiana (resultados não mostrados).

Figura 5-17. Cinética de inibição do *S. aureus* no extrato de PV e nas mantas de PLA/PEG/PV



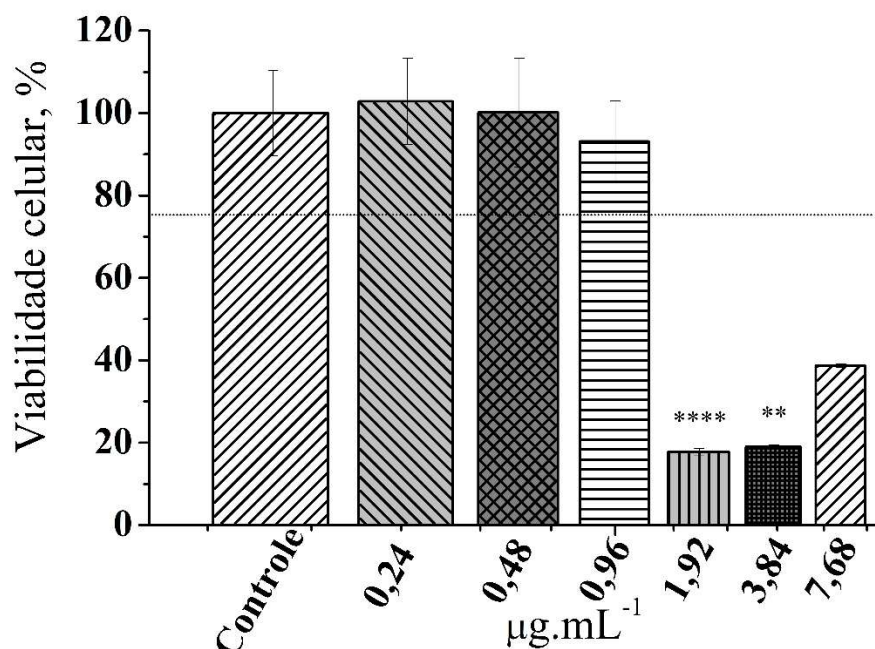
A cinética de crescimento de micro-organismos é um método interessante para avaliar a resposta de determinado fármaco ou dispositivo em relação à taxa de proliferação do fungo/bactéria no meio e é bem explorado na literatura. Estudo com

mantas de poli(ácido acrílico) e poli(álcool vinílico) observaram a inibição de colônias de *Escherichia coli* e *S. aureus* [245]. *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* apresentaram inibição gradual, durante 24h com fibras de zeína contendo óleo essencial de eucalipto e ciclodextrina [246]. Pedacos de bife inoculados com *Bacillus cereus* e cobertos de manta de PEO com óleo essencial de canela e beta-ciclodextrina proteolipossomos foram incubadas por 4 dias, em que se verificou que mesmo a 37°C houve diminuição da população deste micro-organismo de forma controlada [247].

5.2.10 Citotoxicidade

De acordo com a Organização Internacional de Normalização (*International Organization for Standardization*, ISO, em inglês), através da ISO 10993-5:2009, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material ou dispositivo biomédico, podendo realizar outros ensaios *in vitro* ou *in vivo* desde que comprovada que, no mínimo, 75% das células permaneçam vivas no teste [248,249].

Figura 5-18. Viabilidade celular de PBMC em diferentes concentrações de PV

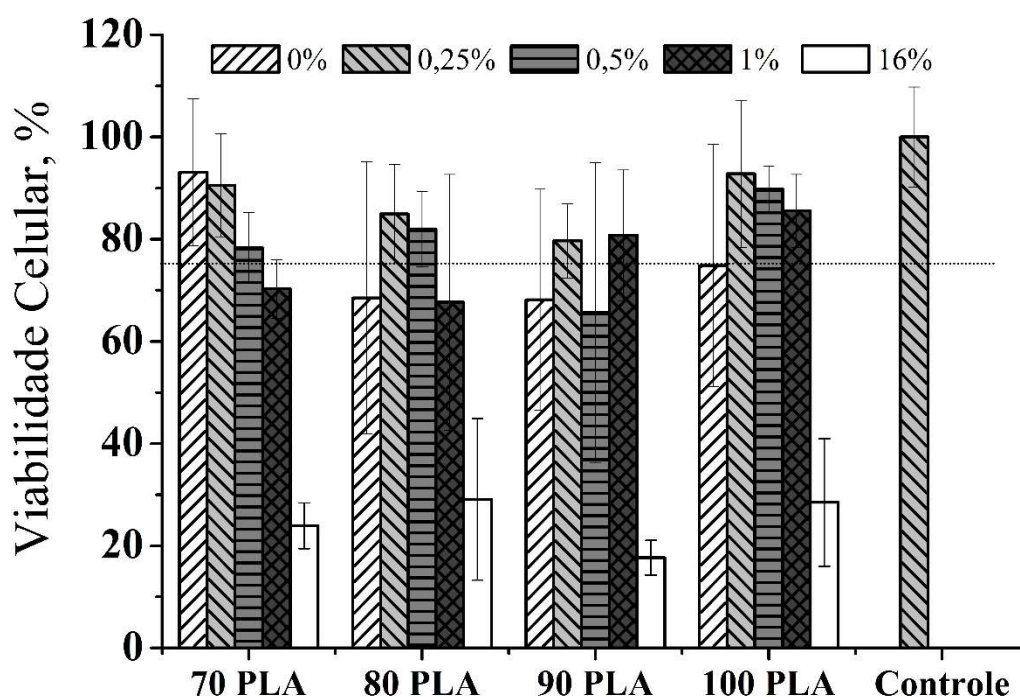


Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão (n=7 para cada fibra). Significativamente diferente do controle: **p<0,01 e ***p<0,0001 (Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn post hoc)

A viabilidade celular foi realizada pela incubação por 24 h do extrato de própolis vermelha com as PBMC com a finalidade de determinar a capacidade metabólica das células em reduzirem o indicador resazurina para resorufina. Percebe-se que o extrato de própolis vermelha é dependente da dose no que se refere ao aumento da citotoxicidade a partir da concentração $1,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,0001$) (Figura 5-18), sendo as concentrações abaixo de $0,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$ biocompatíveis.

A Figura 5-19 apresenta os dados das fibras de PLA/PEG com 0%, 0,25%, 0,50%, 1,0% e 16% de PV. Estas concentrações foram escolhidas para avaliar quais mantas seriam viáveis quando em contato com PBMC.

Figura 5-19. Viabilidade celular de PBMC em mantas de PLA/PEG contendo diferentes porcentagens de PV (m/m) em relação à massa dos polímeros



Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão de 5-7 repetições. Significativamente diferente do controle: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn post hoc).

Observa-se que para as fibras puras, o PEG tende a aumentar a viabilidade celular em comparação com 100PLA, a 70PLA foi a mais viável nesta condição. Estes resultados podem ser ratificados com os encontrados por Escudero-Castellanos *et al.* [250], em que independente da massa de PEG as células continuam viáveis (não há dependência de dose). He, Wang e Ding [248] reportam que ácidos lácticos acima de 40 mmol.L^{-1} já se tornam citotóxicos para células humanas, provavelmente por diminuir o pH do meio e

poderem induzir reações inflamatórias assépticas, como descrito por Bergsma *et al.* [251] ao acompanhar depois de 5 anos parafusos e chapas de PLA implantados em ossos, confirmando a tendência de o PLA se tornar viável dependendo da concentração.

Comparando as fibras contendo própolis, (seção 5.12 sobre cinética de inibição de *S. aureus*) as mantas continham 16% m/m de PV em relação à massa dos polímeros. Contudo, como mostrado na Figura 5-18, estas fibras apresentaram a menor viabilidade celular (<30%), fazendo com que outras concentrações de PV fossem estudadas para esta finalidade. Logo, com 1% (m/m) PV, somente as mantas com 90 e 100PLA se revelaram viáveis. Já com 0,25% (m/m) PV, todas as fibras mantiveram mais de 80% de células vivas. Este fato pode ser justificado devido à quantidade de própolis a ser liberada no meio celular durante o período de incubação e corrobora o resultado da Figura 5-18 sobre sua dependência em relação à concentração, em que acima de $1,92 \mu\text{g.mL}^{-1}$ se tem apenas 20% de células viáveis. Logo, observou-se que quanto menor a concentração de PV nas mantas, maior a viabilidade celular.

Observa-se no trabalho desenvolvido por Bachiega *et al.* [252] para própolis incubadas as citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10 provenientes de macrófagos peritoneais de ratos que geralmente os extratos com 25 $\mu\text{g/poço}$ foram os que mais elevaram os valores das citocinas (sem adição de LPS). Acredita-se que dependendo da concentração de própolis haja ação pro- ou anti-inflamatória modulando a resposta imune/inflamatória ocorrendo de forma sinérgica com ácido coumárico e cinâmico.

5.2.11 Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas parcialmente reduzidas ou excitadas (H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{OOH}$) que atuam na síntese da prostaglandina, na defesa imunológica, em várias reações enzimáticas e em processos de sinalização celular [23,253,254]. Entretanto, o desequilíbrio entre as EROs e os compostos antioxidantes de defesa promove o estresse oxidativo levando à danos estruturais nos lipídeos, proteínas e DNA celulares [23]. A produção das EROs ocorre após a fagocitose como consequência da morte de fungos e bactérias, seja pelo sequestro ou formação excessiva do fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida reduzida (NADPH, do inglês de *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced*) oxidase [255].

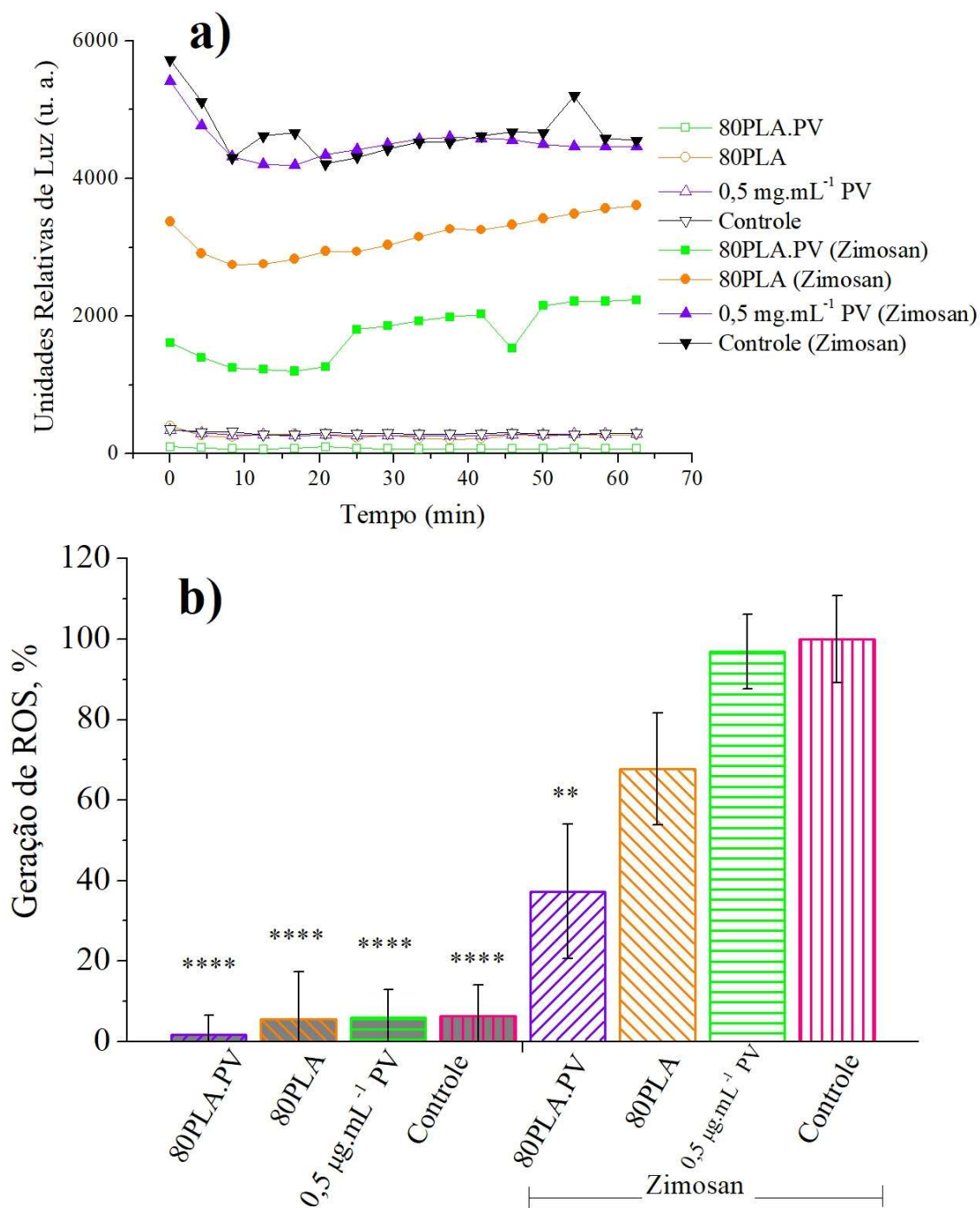
Mediante as concentrações de PV avaliadas na citotoxicidade (Figura 5-18), determinou-se realizar este ensaio na concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para as mantas, as condições de 80 PLA e 0,25% (m/m) de própolis vermelha foram as escolhidas para o ensaio de EROs por apresentar propriedades interessantes e equilibradas em termos de molhabilidade (Figura 5-15); estatisticamente possuir eficiência de encapsulação similares tanto à 100PLA.PV quanto a 70PLA.PV; liberação controlada, por manter estável a concentração do princípio ativo por até 2 dias (Figura 5-16a), assim como ter um ápice de liberação elevado; além de sua viabilidade celular ter sido superior a 80% com 0,25% (m/m) de própolis (Figura 5-19). A fotografia macroscópica das mantas com 0,25% de PV se encontra no Apêndice (Figura A0-5).

A Figura 5-20a mostra que as amostras sem estímulo apresentaram produção de EROs estáveis em função do tempo com baixos níveis de radicais livres presentes. Já com a adição do zimosan, os primeiros cinco minutos possuem as maiores intensidades de EROs, o que sugerem a ação dos neutrófilos que são células responsáveis pela fagocitose de micro-organismos, sendo a primeira linhagem de defesa do hospedeiro [256,257].

Logo, observa-se que com o zimosan o extrato de própolis manteve o nível de EROs produzidas pelo controle, que é a referência na concentração dos radicais livres sem tratamento quando o organismo está sob alguma ameaça. Ou seja, o extrato de PV não apresentou atividade antioxidante. Provavelmente, a concentração de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato de PV ainda seja elevada para equilibrar a formação de EROS e estimular os compostos antioxidantes de defesa no meio celular devido à esta amostra ser dependente da dose como mostrado na viabilidade celular (Figura 5-18). Portanto, há necessidade de se realizar este ensaio com diferentes concentrações de PV para se verificar sua atividade na diminuição da produção de EROs.

Ainda com estímulo de zimosan, a manta 80PLA apresentou uma tendência a inibir a produção de EROs em comparação ao controle, possivelmente devido aos elétrons livres nos oxigênios dos grupamentos $-\text{O}-\text{C}=\text{O}$ de ácido carboxílico dos monômeros lácticos e $\text{C}=\text{O}$ de éter dos etilenos glicóis atraírem eletrostaticamente os radicais livres do meio, promovendo hidrólise dos polímeros e, consequente, estabilização dos EROs formando H_2O com H_2O_2 , $\bullet\text{OH}$ e $\bullet\text{OOH}$, desativação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pela transferência física de energia, além de outros produtos de massa molar maiores [258–260].

Figura 5-20. a) Avaliação de EROs em função do tempo e b) geração de EROs estimulados com zimosan opsonizado



Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão (n=9). Significativamente diferente do controle com zimosan: **p<0,01 e **** p<0,0001 (Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn post hoc).

Quanto a manta de 80PLA.0,25PV, pode-se observar que esta foi a condição que mais inibiu a formação dos radicais livres quando o zimosan estava presente, inclusive nos primeiros 5 minutos em que há maior formação de EROs. Esta ação é devido à baixa concentração de própolis vermelha liberada da manta para o meio, confirmando a

dependência da dosagem este extrato, além de os flavonoides serem compostos antioxidantes que sequestram oxigênio singlete e são também potentes inativadores de radicais livres por seus grupos -OH de fenóis doarem facilmente este hidrogênio para o meio, formando água e moléculas estáveis [261,262]. Acredita-se também que a própolis vermelha nesta concentração atuou sinergicamente com o PLA e o PEG das fibras, diminuindo a produção de EROs.

A Figura 5-20b revela que as condições sem zimosan entre si não possuem significância estatística ($p > 0,05$), ou seja, as células em contato com as amostras se comparam ao controle, apesar a manta 80PLA.0,25PV ter a tendência de não induzirem EROs. Em relação ao controle com zimosan, todas são estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). Quanto as amostras contendo zimosan, observa-se que somente a manta 80PLA.0,25PV ($p < 0,01$) se diferencia do controle com zimosan, sendo a que menos induz a produção de EROs.

A opsonização do zimosan faz com que o sistema inume induza o processo fagocítico através da via metabólica para produzir as EROs e, consequente, ativação da NADPH-oxidase [178,263]. A condição de estresse oxidativo está associada a inflamações e infecções, como feridas e sepse, assim como em doenças neurológicas, como Parkinson.

Mantas de PCL-gelatina contendo nanopartículas de óxido de cério também reduziram significativamente a quantidade de H_2O_2 em embriofibroblastos 3T3-L1 de ratos [151]. Fibras de seda incorporadas com extrato de sementes de uva e vitamina E mantiveram as células L929 vivas em meio à estresse oxidativo com peróxido de butilo terciário (*t*-BHP, *tertiary butyl peroxide*, do inglês) [264,265].

Desta forma, conclui-se que apesar de o extrato de PV não ter sido eficaz em modular radicais livres por EROs pela via de estimulação por zimosan, esta apresentou ação antibacteriana frente à *S. aureus*, corroborando com a literatura seu potencial como princípio ativo para ser utilizado em mantas poliméricas como dispositivo transdérmico no tratamento de feridas. As fibras de PLA com PEG com diferentes molhabilidades apresentaram também diferentes quantidades de incorporação da PV nas mantas, assim como diferentes liberações de própolis em PBS, velocidades de inibição de *S. aureus* e viabilidades celulares, cujas modificações foram mediante ao aumento da concentração de PEG. A condição 80PLA.PV foi a mais equilibrada nos termos descritos, sendo provavelmente a melhor formulação para aplicação como dispositivo transdérmico no tratamento de feridas.

5.2.12 Modulação de citocinas

Citocinas são pequenas proteínas liberadas pelas células possuindo um efeito específico na interação e comunicação entre outras células. Elas podem atuar nas células que as secretam (ação autócrina), em suas proximidades (ação parácrina) ou em locais mais distantes (ação endócrina). Comumente, diferentes tipos de células secretam a mesma citocina ou uma única citocina interage com diferentes tipos de células (pleiotropia). Elas podem ser classificadas em citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, havendo evidência significativa que algumas delas estão envolvidas na iniciação e persistência de dores e inflamações [266,267].

A Figura 5-21 mostra ação das citocinas pelo método de ELISA sanduíche em células PBMC em contato com as amostras por 24h. As dosagens foram realizadas com a interleucina (IL) IL-4 que é anti-inflamatória; pró-inflamatória, utilizou-se o fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumor Necrosis Factor Alfa*, TNF- α); anti- ou pró-inflamatória dependendo das circunstâncias, avaliou-se a IL-6 e o fator de transformação de crescimento beta (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*, TGF- β); e imunorregulatória, IL-10. As amostras estudadas foram a PV (0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e as mantas (80PLA e 80PLA com 0,25% m/m PV, 80PLA.PV).

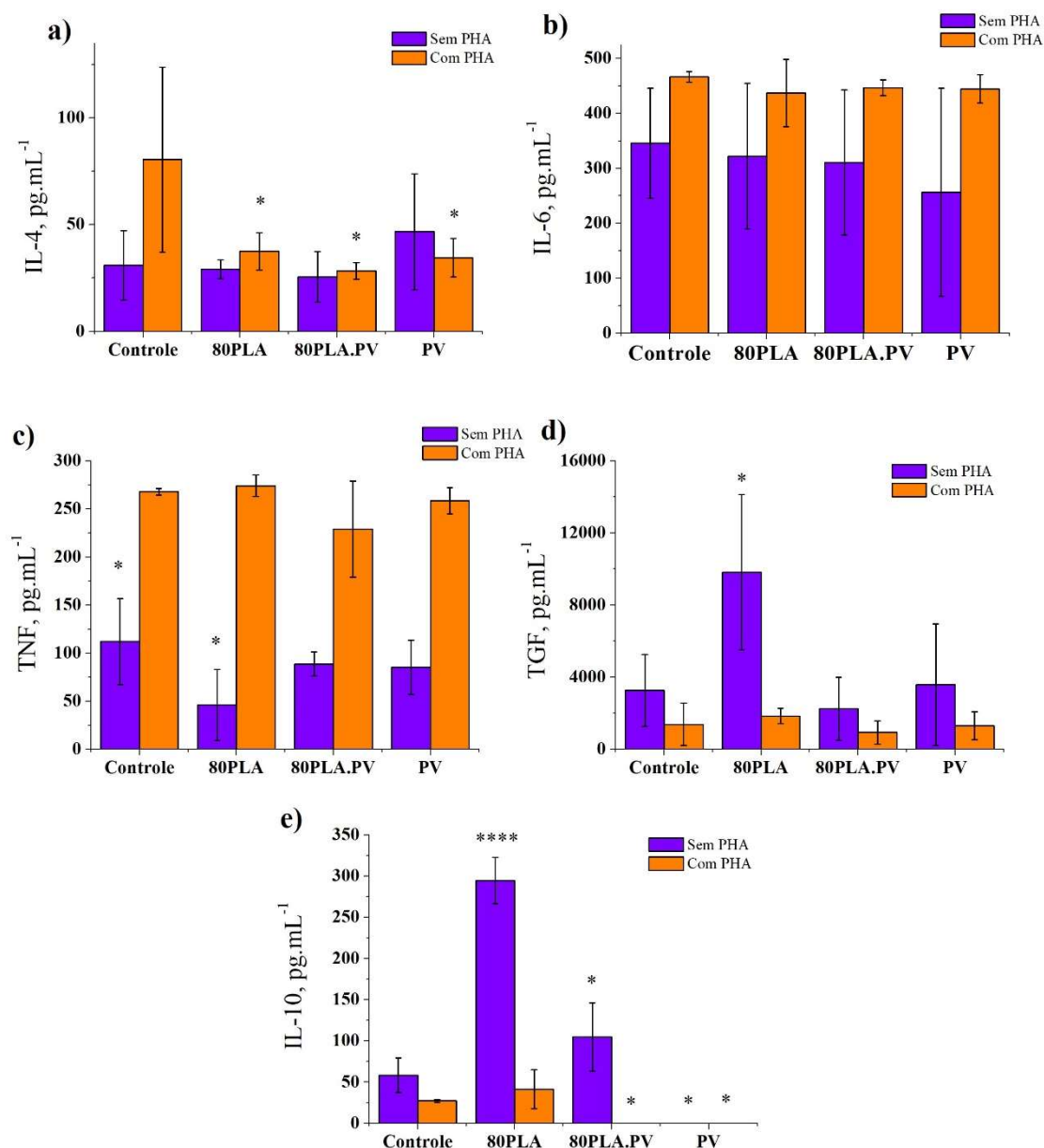
Ao se comparar as amostras com o meio de cultura sem PHA (controle), observa-se que IL-4 e IL-6 não possuem diferença significativa em nenhuma condição. Contudo, para IL-10 há diminuição para a PV ($p < 0,05$) e aumento para 80PLA ($p < 0,0001$) e 80PLA.PV ($p < 0,05$); e aumento de concentração de TNF- α e TGF- β para a manta 80PLA ($p < 0,05$).

Na presença do meio com PHA, a PV e as mantas não modulam a ação de TNF- α , TGF- β e IL-6. Porém, a PV e as mantas diminuem a concentração de IL-4 ($p < 0,05$); e para IL-10, tanto PV quanto 80PLA.PV modulam sua ação. A ação destas citocinas foram similares aos encontrados por Bachiega et al. e Bueno-Silva et al. [268,269] para própolis.

Em termos de aplicação das mantas, acredita-se que a manta com PV pode ser utilizado no tratamento de queimaduras visando a diminuição de IL-10. No trabalho desenvolvido por Dehne et al. [270] com marcadores de citocinas em pacientes que possuíam mais de 30% de seu corpo queimado, é possível analisar altas concentrações de IL-6, IL-8, IL-10, IL-13 em comparação a pacientes saudáveis, sendo a IL-10 a citocina de maior concentração encontrada nas fases iniciais do trauma. De acordo com Sherry et al.

[271] e Lyons et al. [272], elevadas concentrações de IL-10 podem contribuir para elevada incidência de infecção e sepsis neste tipo de paciente.

Figura 5-21. Liberação de citocinas por células de PBMC incubadas com PV e as fibras de 80PLA e 80PLA.PV. Titulação de a) IL-4, b) IL-6, c) TNF- α , d) TGF- β e e) IL-10.



Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio-padrão (n=4). Significativamente diferente do controle sem ou com PHA: *p<0,05 e ****p<0,0001 (Teste de Holm-Sidak).

Há também a possibilidade de se utilizar a PV e as mantas para acelerar a fase de proliferação celular e consequente influxo de queratinócitos em feridas atópicas agudas, uma vez que elevados níveis de IL-4 fazem com que haja retardo no fechamento de suas beiradas devido à baixa produção de fibronectina [273–275].

Em ambas sugestões, estudos *in vivo* devem ser realizados para comprovar a eficácia da PV e mantas na cicatrização destes tipos de feridas.

Mediante estes resultados, tem-se como sugestão a aplicação da manta de 80PLA como *band-aid* em feridas de doenças autoimunes como a psoríase e para a 80PLA.PV, em infecções de bactérias intracelulares, como a leishmania.

5.3 CONCLUSÕES

A própolis vermelha encontrada na região de mangue do litoral nordestino do Brasil possui concentrações de flavonoides e fenóis superiores às descritas pelo Ministério da Agricultura e estão associados aos marcadores formononetina, bolosontol e biochanina A, por serem seus compostos majoritários, como retratados pelo CLAE. Desta forma, consequente atividade antioxidante também pode ser observada. Este extrato tem potencial para atividade antimicrobiana na concentração de $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em relação ao *S. aureus*, além de ser viável em células humanas em concentrações abaixo de $0,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Fibras de 12% (m/v) de PLA/PEG em DMC incorporadas com 16% (m/m) de extrato etanólico seco de própolis vermelha foram desenvolvidas com sucesso. A adição de PEG fez com que houvesse aumento na concentração de PV na superfície das mantas e aumento de suas molhabilidades. Mudanças na morfologia das fibras não foram observadas devido à adição de PV ou PEG, que apresentaram fibras lisas e emaranhadas. Observou-se que a PV diminuiu a estabilidade térmica das mantas em comparação às sem esta substância. Em termos de liberação controlada, tem-se que o equilíbrio ideal entre concentração liberada e estabilização das concentrações de PV em função foram obtidas com até 20% de PEG, uma vez que a manta 70PLA.PV após chegar à sua concentração máxima de PV liberada, cai aceleradamente. Este comportamento pode ser justificado pela diminuição da compatibilidade química entre PLA e PEG, fazendo com que o PEG e os flavonoides da PV fiquem preferencialmente mais próximos da superfície das fibras. As mantas apresentaram velocidade de inibição contra *S. aureus* de forma proporcional à concentração de PEG presente.

As fibras com até 1% (m/m) de PV se tornaram viáveis para aplicação em células periféricas sanguíneas mononucleares (PBMC), cujo mecanismo de produção de EROs para a manta 80PLA com 0,25% de PV mostra baixa produção destas espécies. Observou-se que a PV e as mantas com PV promoveram ação modulatória com IL-4 e IL-10. Desta forma, acredita-se que as fibras desenvolvidas neste trabalho possuam potencial aplicação para cicatrização de feridas agudas ou queimaduras. Estudos sobre mecanismos de ação em citocinas e teste *in vivo* ainda precisam ser realizados para comprovar eficácia do dispositivo quando em contato com a pele.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como desdobramento da presente pesquisa, pode-se ainda destacar como sugestões para trabalhos futuros:

- Investigar as interações polímero-PV-meio através dos parâmetros de solubilidade durante a liberação controlada;
- Avaliar a cinética de liberação da PV em PBS;
- Simular a liberação da PV em BHI caldo e RPMI para estudar o perfil de dissolução da PV em meios de crescimento bacteriano e celular, respectivamente;
- Analisar o perfil de inibição microbiológico de micro-organismos que colonizam feridas, como *Staphylococcus*, *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Porphyromonas* e *Streptococcus* sp.;
- Estudar estímulos das mantas em relação à citocinas pró- e anti-inflamatórias com a finalidade de se definir os mecanismos de ação das fibras;
- Verificar a ação cicatrizante *in vivo* das mantas em relação à doenças infecciosas, autoimunes ou queimaduras cutâneas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliography

- [1] E.A. Gantwerker, D.B. Hom, Skin: Histology and physiology of wound healing, *Clin. Plast. Surg.* 39 (2012) 85–97. doi:10.1016/j.cps.2011.09.005.
- [2] S. Saghazadeh, C. Rinoldi, M. Schot, S.S. Kashaf, F. Sharifi, E. Jalilian, K. Nuutila, G. Giatsidis, P. Mostafalu, H. Derakhshandeh, K. Yue, W. Swieszkowski, A. Memic, A. Tamayol, A. Khademhosseini, Drug delivery systems and materials for wound healing applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018). doi:10.1016/j.addr.2018.04.008.
- [3] A. Guerra, J. Belinha, R.N. Jorge, Modelling skin wound healing angiogenesis: A review, *J. Theor. Biol.* 459 (2018) 1–17. doi:10.1016/j.jtbi.2018.09.020.
- [4] H.S. Kim, X. Sun, J.-H. Lee, H.-W. Kim, X. Fu, K.W. Leong, Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018). doi:https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.014.
- [5] R.G. Frykberg, J. Banks, Challenges in the Treatment of Chronic Wounds, *Adv. Wound Care.* 4 (2015) 560–582. doi:10.1089/wound.2015.0635.
- [6] S. Dhivya, E. Padma, Viswanadha Vijaya Santhini, Wound dressings – a review, *Biomed.* 5 (2015) 24–28. doi:10.7603/s40681-015-0022-9.
- [7] T.S. Stashak, E. Farstvedt, A. Othic, Update on Wound Dressings: Indications and Best Use, *Clin. Tech. Equine Pract.* 3 (2004) 148–163. doi:10.1053/j.ctep.2004.08.006.
- [8] R.A.F. Clark, K. Ghosh, M.G. Tonnesen, Tissue engineering for cutaneous wounds, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1018–1029. doi:10.1038/sj.jid.5700715.
- [9] S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco, *Acta Farm. Bonaer.* 21 (2002) 99–106.
- [10] N. Mishra, N.P. Yadav, J.G. Meher, P. Sinha, Phyto-vesicles: Conduit between conventional and novel drug delivery system, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2 (2012) S1728–S1734. doi:10.1016/S2221-1691(12)60485-7.
- [11] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials Science - An introduction to materials in medicine*, Academic Press, San Diego, California, USA, 1996. doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00148-0.
- [12] V.M. Bispo, Estudo do efeito da reticulação por genipin em suportes biocompatíveis de quitosana-PVA, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009. http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-8DUJPR/viviane_mota_bispo.pdf?sequence=1.
- [13] R.B. Oliveira, E.M. Lima, Polímeros Na Obtenção De Sistemas De Liberação De Fármacos Polymers in Drug Delivery Systems, *Rev. Eletrônica Farmácia.* 3 (2006) 29–35. <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/viewFile/2072/2014?journal=REF>.
- [14] I.R. Bell, G.E. Schwartz, N.N. Boyer, M. Koithan, A.J. Brooks, Advances in integrative nanomedicine for improving infectious disease treatment in public health, *Eur. J. Integr. Med.* 5 (2013) 126–140. doi:10.1016/j.eujim.2012.11.002.
- [15] C. Feng, K.C. Khulbe, T. Matsuura, Recent Progress in the Preparation, Characterization, and Applications of Nanofibers and Nanofiber Membranes via Electrospinning/Interfacial Polymerization, *J. Appl. Polym. Sci.* 115 (2010) 756–776. doi:10.1002/app.
- [16] E.J. Lee, S.H. Teng, T.S. Jang, P. Wang, S.W. Yook, H.E. Kim, Y.H. Koh, Nanostructured poly(ϵ -caprolactone)-silica xerogel fibrous membrane for guided bone regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 3557–3565. doi:10.1016/j.actbio.2010.03.022.
- [17] Z. Zhang, J. Hu, P.X. Ma, Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1129–1141. doi:10.1016/j.addr.2012.04.008.
- [18] E.T. da C. Almeida, M.C.D. Silva, J.M. dos S. Oliveira, R.U. Kamiya, R.E. dos S. Arruda, D.A. Vieira, V. da C. Silva, P.B. Escodro, I.D. Basílio-Júnior, T.G. Nascimento, Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract, *J. Pharm. Anal.* 7 (2017) 280–287. doi:10.1016/j.jpha.2017.03.004.
- [19] M.V.M. das Neves, T.M.S. da Silva, E. de Oliveira Lima, E.V.L. da Cunha, E. de J. Oliveira, Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp, *Brazilian J. Microbiol.* 47 (2016) 159–166. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.009.
- [20] S.M. Alencar, T.L.C. Oldoni, M.L. Castro, I.S.R. Cabral, C.M. Costa-Neto, J.A. Cury, P.L. Rosalen, M.

- Ikegaki, Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis, *J. Ethnopharmacol.* 113 (2007) 278–283. doi:10.1016/j.jep.2007.06.005.
- [21] W.N. Hozzein, G. Badr, A.A. Al Ghamdi, A. Sayed, N.S. Al-Waili, O. Garraud, Topical application of propolis enhances cutaneous wound healing by promoting TGF-beta/smad-mediated collagen production in a streptozotocin-induced type I diabetic mouse model, *Cell. Physiol. Biochem.* 37 (2015) 940–954. doi:10.1159/000430221.
- [22] A. Oryan, E. Alemzadeh, A. Moshiri, Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities, *Biomed. Pharmacother.* 98 (2018) 469–483. doi:10.1016/j.biopha.2017.12.069.
- [23] L. Wiley, D. Ashok, C. Martin-Ruiz, D.C.S. Talbot, J. Collerton, A. Kingston, K. Davies, P.F. Chinnery, M. Catt, C. Jagger, T.B.L. Kirkwood, T. Von Zglinicki, Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction in white blood cells are not valid biomarkers of ageing in the very old, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0091005.
- [24] J.R. Dias, P.L. Granja, P.J. Bártolo, Advances in electrospun skin substitutes, *Prog. Mater. Sci.* 84 (2016) 314–334. doi:10.1016/j.pmatsci.2016.09.006.
- [25] L.H.C. Medeiros, Eliton Souto; Glenn, G. M.; Klamczynski, A. P.; Orts, W. J.; Mattoso, Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions, *J. Appl. Polym. Sci.* 113 (2009) 2322–2330. doi:10.1002/app.
- [26] H. Lee, C. Song, S. Baik, D. Kim, T. Hyeon, D.-H. Kim, Device-assisted transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2017). doi:10.1016/j.addr.2017.08.009.
- [27] A. Young, C.E. McNaught, The physiology of wound healing, *Surg. (United Kingdom).* 35 (2011) 475–479. doi:10.1016/j.mpsur.2017.06.004.
- [28] C.G. Tsiouris, M.G. Tsiouri, Human microflora, probiotics and wound healing, *Wound Med.* 19 (2017) 33–38. doi:10.1016/j.wndm.2017.09.006.
- [29] B.L. Seal, T.C. Otero, A. Panitch, Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mater. Sci. Eng. R.* 34 (2001) 147–230. doi:10.1016/S0927-796X(01)00035-3.
- [30] S. Singh, A. Young, C.E. McNaught, The physiology of wound healing, *Surg. (United Kingdom).* 35 (2017) 473–477. doi:10.1016/j.mpsur.2017.06.004.
- [31] R.L. Sheridan, *Skin Substitutes in Burn Care*, 25 (1999) 97–103.
- [32] I.C.L. Souza, Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas, Universidade Tiradentes, 2013.
- [33] INOVA Newsroom, Wound Healing Center at Inova Loudoun treats complex wound and ostomy cases | Inova Newsroom, (2017) 1. <https://www.inovanewsroom.org/ilh/2017/05/wound-healing-center-at-inova-loudoun-treats-complex-wound-and-ostomy-cases/> (accessed July 24, 2018).
- [34] S.B. VIDOR, E.A. CONTESINI, Cicatrização de Feridas — Bloco Cirúrgico de Ensino e Pesquisa FAVET/UFRGS, (2018). <http://www.ufrgs.br/blocodeensinofavet/ensino/tecnica-cirurgica/cicatrizacao-de-feridas> (accessed January 21, 2019).
- [35] C.P. Bergmann, A. Stumpf, Dental ceramics: Microstructure, properties and degradation, in: *Dent. Ceram. Microstruct. Prop. Degrad.*, 1st ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013: pp. 9–13. doi:10.1007/978-3-642-38224-6.
- [36] A.C.S. Carneiro, Obtenção de cerâmicas à base de tricálcio fosfatos utilizando óxido de magnésio como aditivo, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007. <http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/123456789/15539/1/AndreaCSC.pdf>.
- [37] A.L.R. Pires, A.C.K. Bierhalz, Â.M. Moraes, Biomaterials: Types, Applications, and Market, *Quim. Nova.* 38 (2015) 957–971. doi:10.5935/0100-4042.20150094.
- [38] T.S. Hin, *Engineering Materials for Biomedical Applications*, WORLD SCIENTIFIC, 2004. doi:10.1142/5673.
- [39] A.P. V Pereira, W.L. Vasconcelos, R.L. Oréface, Novos biomateriais: híbridos orgânico-inorgânicos bioativos, *Polímeros.* 9 (1999) 104–109. doi:10.1590/S0104-14281999000400018.
- [40] I.V.S.R. Nascimento, R.C.A. Leal, M.V.L. Fook, R.C. Meira, Esterilização de membranas de quitosana para utilização como biomaterial, in: *Congr. Lat. Am. Órgãos Artif. e Biomateriais*, Natal, RN, 2012: p. 13. <http://bemvin.org/esterilizaco-de-membranas-de-quitosana-para-utilizaco-como-bio.html?page=2>.
- [41] B.R. Pezzini, M.A.S. Silva, H.G. Ferraz, Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados, *Rev. Bras. Ciências Farm.* 43 (2007) 12. doi:10.1590/S1516-93322007000400002.
- [42] C. PEREIRA DE MAURO, *Comprimidos De Liberação Controlada*, (2007) 46.
- [43] M.A.M. De Lyra, J.L. Soares-Sobrinho, M.T. Brasileiro, M.F. De La Roca, J.A. Barraza, O.D.S. Viana, P.J. Rolim-Neto, Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos, *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (2007) 784–793.

- [44] C.T. Huynh, D.S. Lee, Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials, *Encycl. Polym. Nanomater.* (2014) 1–12. doi:10.1007/978-3-642-36199-9.
- [45] A.S. Prata, Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa, Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- [46] J.C.O. Villanova, R.L. Oréfice, A.S. Cunha, Aplicações Farmacêuticas de Polímeros, *Polímeros Ciência e Tecnol.* 20 (2010) 51–64. doi:10.1590/S0104-14282010005000009.
- [47] A. Faridi Esfajani, S.M. Jafari, Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 146 (2016) 532–543. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.06.053.
- [48] O. Pillai, R. Panchagnula, Polymers in drug delivery, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 447–451.
- [49] M.A. Woodruff, D.W. Hutmacher, The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century, *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 1217–1256. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.
- [50] Y.S. Zhao, H. Fu, A. Peng, Y. Ma, D. Xiao, J. Yao, Low-dimensional nanomaterials based on small organic molecules: Preparation and optoelectronic properties, *Adv. Mater.* 20 (2008) 2859–2876. doi:10.1002/adma.200800604.
- [51] N.P. Truong, J.F. Quinn, M. V. Dussert, N.B.T. Sousa, M.R. Whittaker, T.P. Davis, Reproducible access to tunable morphologies via the self-assembly of an amphiphilic diblock copolymer in water, *ACS Macro Lett.* 4 (2015) 381–386. doi:10.1021/acsmacrolett.5b00111.
- [52] S. Cho, S.-H. Jung, K.-H. Lee, Morphology-Controlled Growth of ZnO Nanostructures Using Microwave Irradiation: from Basic to Complex Structures, *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 12769–12776. doi:10.1021/jp803783s.
- [53] R.G.F. Costa, J.E. De Oliveira, G.F. De Paula, E.S. De Medeiros, C. Ribeiro, L.H.C. Mattoso, P.H. de S. Picciani, Eletrofiação de Polímeros em Solução. Parte I: Fundamentação Teórica, *Polímeros.* 22 (2012) 170–177. doi:10.1590/S0104-14282012005000026.
- [54] L.G. Maroni, W.T. Publio Filho, J. Saito, C.G. Lima, Classificação, Identificação e Aplicações de Nãotecidos, 1999. http://www.abint.org.br/pdf/Manual_ntecidos.pdf (accessed August 3, 2017).
- [55] C.J. Ellison, A. Phatak, D.W. Giles, C.W. Macosko, F.S. Bates, Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup, *Polymer (Guildf).* 48 (2007) 3306–3316. doi:10.1016/j.polymer.2007.04.005.
- [56] R.R. Bresee, W. Ko, Fiber Formation During Melt Blowing, *Inj.* (2003) 21–28.
- [57] J.E.D. Oliveira, E.A. Moraes, R.G.F. COSTA, A.S. AFONSO, L.H.C. MATTOSO, W.J. ORTS, E.S. MEDEIROS, Nano and Submicrometric Fibers of Poly(D,L-Lactide) Obtained by Solution Blow Spinning: Process and Solution Variables, *J. Appl. Polym. Sci.* 122 (2011) 3396–3405. doi:10.1002/app.
- [58] J.E. Oliveira, L.H.C. Mattoso, W.J. Orts, E.S. Medeiros, Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study, *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/409572.
- [59] J.E. Oliveira, E.A. Moraes, J.M. Marconcini, L.H.C. Mattoso, G.M. Glenn, E.S. Medeiros, Properties of poly(lactic acid) and poly(ethylene oxide) solvent polymer mixtures and nanofibers made by solution blow spinning, *J. Appl. Polym. Sci.* 129 (2013) 3672–3681. doi:10.1002/app.39061.
- [60] S. Srinivasan, S.S. Chhatre, J.M. Mabry, R.E. Cohen, G.H. McKinley, Solution spraying of poly(methyl methacrylate) blends to fabricate microtextured, superoleophobic surfaces, *Polymer (Guildf).* 52 (2011) 3209–3218. doi:10.1016/j.polymer.2011.05.008.
- [61] J.L. Daristotle, A.M. Behrens, A.D. Sandler, P. Kofinas, A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow Spinning, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 8 (2016) 34951–34963. doi:10.1021/acsami.6b12994.
- [62] E.L.G. Medeiros, A.L. Braz, I.J. Porto, A. Menner, A. Bismarck, A.R. Boccaccini, W.C. Lepry, S.N. Nazhat, E.S. Medeiros, J.J. Blaker, Porous Bioactive Nanofibers via Cryogenic Solution Blow Spinning and Their Formation into 3D Macroporous Scaffolds, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2 (2016) 1442–1449. doi:10.1021/acsbiomaterials.6b00072.
- [63] F. Liu, S. Li, Y. Fang, F. Zheng, J. Li, J. He, Fabrication of highly oriented nanoporous fibers via airflow bubble-spinning, *Appl. Surf. Sci.* 421 (2017) 61–67. doi:10.1016/j.apsusc.2017.01.204.
- [64] R.F. Bonan, P.R.F. Bonan, A.U.D. Batista, D.E.C. Perez, L.R.C. Castellano, J.E. Oliveira, E.S. Medeiros, Poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) membranes produced by solution blow spinning: Structure, thermal, spectroscopic, and microbial barrier properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 134 (2017) 1–9. doi:10.1002/app.44802.
- [65] P. Gupta, C. Elkins, T.E. Long, G.L. Wilkes, Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): Exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent, *Polymer (Guildf).* 46 (2005) 4799–4810.

- doi:10.1016/j.polymer.2005.04.021.
- [66] J.E. De Oliveira, Nanofibras poliméricas aplicadas em sensores e biossensores, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 2011.
 - [67] J. Oliveira, G.S. Brichi, J.M. Marconcini, L.H.C. Mattoso, G.M. Glenn, E.S. Medeiros, Effect of solvent on the physical and morphological properties of poly(lactic acid) nanofibers obtained by solution blow spinning, *J. Eng. Fiber. Fabr.* 9 (2014) 117–125.
 - [68] J. Teno, G. González-Gaitano, J. González-Benito, Poly (ethylene-co-vinyl acetate) films prepared by solution blow spinning: Surface characterization and its relation with *E. coli* adhesion, *Polym. Test.* 60 (2017) 140–148. doi:10.1016/j.polymertesting.2017.03.020.
 - [69] J.E. Oliveira, V. Zucolotto, L.H. Mattoso, E.S. Medeiros, Multi-walled carbon nanotubes and poly(lactic acid) nanocomposite fibrous membranes prepared by solution blow spinning, *J Nanosci Nanotechnol.* 12 (2012) 2733–2741. doi:10.1166/jnn.2012.5730.
 - [70] S. Seif, L. Franzen, M. Windbergs, Overcoming drug crystallization in electrospun fibers - Elucidating key parameters and developing strategies for drug delivery, *Int. J. Pharm.* 478 (2015) 390–397. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.11.045.
 - [71] J. Pelipenko, P. Kocbek, J. Kristl, Critical attributes of nanofibers: Preparation, drug loading, and tissue regeneration, *Int. J. Pharm.* 484 (2015) 57–74. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.02.043.
 - [72] M. Liu, X.P. Duan, Y.M. Li, D.P. Yang, Y.Z. Long, Electrospun nanofibers for wound healing, *Mater. Sci. Eng. C.* 76 (2017) 1413–1423. doi:10.1016/j.msec.2017.03.034.
 - [73] X. Wang, B. Ding, B. Li, Biomimetic electrospun nanofibrous structures for tissue engineering, *Mater Today (Kidlington)*. 16 (2013) 229–214. doi:10.1016/j.mattod.2013.06.005.
 - [74] J. Wang, V. Planz, B. Vukosavljevic, M. Windbergs, Multifunctional electrospun nanofibers for wound application – novel insights into the control of drug release and antimicrobial activity, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* (2018). doi:10.1016/j.ejpb.2018.05.035.
 - [75] H. Karakas, Electrospinning of Nanofibers and Their Applications, 3 (2014) 126–131.
 - [76] A.M. Behrens, B.J. Casey, M.J. Sikorski, K.L. Wu, W. Tutak, A.D. Sandler, P. Kofinas, In situ deposition of PLGA nanofibers via solution blow spinning, *ACS Macro Lett.* 3 (2014) 249–254. doi:10.1021/mz500049x.
 - [77] F.M. Manschot, J. J.M. Brakkee, THE MEASUREMENT AND MODELLING OF THE MECHANICAL PROPERTIES OF HUMAN SKIN IN VIVO-II. THE MODEL, *J. Biomech.* 19 (1986) 517–521.
 - [78] M. Pawlacyk, M. Lelonkiewicz, M. Wieczorowski, Age-dependent biomechanical properties of the skin, *Postep. Dermatologii i Alergol.* 30 (2013) 302–306. doi:10.5114/pdia.2013.38359.
 - [79] C. Jacquemoud, K. Bruyere-Garnier, M. Coret, Methodology to determine failure characteristics of planar soft tissues using a dynamic tensile test, *J. Biomech.* 40 (2007) 468–475. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.12.010.
 - [80] J. Pan, N. Liu, H. Sun, F. Xu, Preparation and Characterization of Electrospun PLCL/Poloxamer Nanofibers and Dextran/Gelatin Hydrogels for Skin Tissue Engineering, *PLoS One.* 9 (2014) e112885. doi:10.1371/journal.pone.0112885.
 - [81] D. Atila, D. Keskin, A. Tezcaner, Cellulose acetate based 3-dimensional electrospun scaffolds for skin tissue engineering applications, *Carbohydr. Polym.* 133 (2015) 251–261. doi:10.1016/j.carbpol.2015.06.109.
 - [82] M. Gümüşderelioglu, S. Dalkiranoğlu, R.S.T. Aydin, S. Çakmak, A novel dermal substitute based on biofunctionalized electrospun PCL nanofibrous matrix, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 98 A (2011) 461–472. doi:10.1002/jbm.a.33143.
 - [83] J.I. Kim, H.R. Pant, H.J. Sim, K.M. Lee, C.S. Kim, Electrospun propolis/polyurethane composite nanofibers for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 44 (2014) 52–57. doi:10.1016/j.msec.2014.07.062.
 - [84] G. Perumal, S. Pappuru, D. Chakraborty, A. Maya Nandkumar, D.K. Chand, M. Doble, Synthesis and characterization of curcumin loaded PLA—Hyperbranched polyglycerol electrospun blend for wound dressing applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 76 (2017) 1196–1204. doi:10.1016/j.msec.2017.03.200.
 - [85] M. Karamanlioglu, R. Preziosi, G.D. Robson, Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review, *Polym. Degrad. Stab.* 137 (2017) 122–130. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.009.
 - [86] X. Li, Y. Liu, H. Peng, X. Ma, H. Fong, Effects of hot airflow on macromolecular orientation and crystallinity of melt electrospun poly (L-lactic acid) fibers, *Mater. Lett.* 176 (2016) 194–198. doi:10.1016/j.matlet.2016.04.070.
 - [87] A.J.R. Lasprilla, G.A.R. Martinez, B.H. Lunelli, A.L. Jardini, R.M. Filho, Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 321–328.

- doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.019.
- [88] K. Madhavan Nampoothiri, N.R. Nair, R.P. John, An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 8493–8501. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.092.
 - [89] A. S??derg??rd, M. Stolt, Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition, *Prog. Polym. Sci.* 27 (2002) 1123–1163. doi:10.1016/S0079-6700(02)00012-6.
 - [90] E. Castro-Aguirre, F. Iñiguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras, Poly(lactic acid)-Mass production, processing, industrial applications, and end of life, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107 (2016) 333–366. doi:10.1016/j.addr.2016.03.010.
 - [91] B. Gupta, N. Revagade, J. Hilborn, Poly(lactic acid) fiber: An overview, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 455–482. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.01.005.
 - [92] L. Fambri, A. Pegoretti, R. Fenner, S.D. Incardona, C. Migliaresi, Biodegradable fibres of poly(l-lactic acid) produced by melt spinning, *Polymer (Guildf)*. 38 (1997) 79–85. doi:10.1016/S0032-3861(96)00486-7.
 - [93] N.R. Nair, K.M. Nampoothiri, R. Banarjee, G. Reddy, Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of jackfruit seed powder (JFSP) to L-lactic acid and to polylactide polymer, *Bioresour. Technol.* 213 (2016) 283–288. doi:10.1016/j.biortech.2016.03.020.
 - [94] Y. Zhao, Z. Wang, J. Wang, H. Mai, B. Yan, F. Yang, Direct Synthesis of Poly (D , L -lactic acid) by Melt Polycondensation and Its Application in Drug Delivery, *J. Appl. Polym. Sci.* 91 (2003) 2143–2150.
 - [95] M. Ajioka, K. Enomoto, S. K., The basic properties of poly lactic acid produced by the direct condensation polymerisation of lactic acid, *J. Environ. Polym. Degrad.* 3 (1995) 225–234. doi:10.1007/BF02068677.
 - [96] R.M. Rasal, A. V. Janorkar, D.E. Hirt, Poly(lactic acid) modifications, *Prog. Polym. Sci.* 35 (2010) 338–356. doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003.
 - [97] A. Albertsson, I. Varma, Recent Developments in Ring Opening Polymerization of Lactones for Biomedical Applications, *Biomacromolecules*. 4 (2003) 1466–1486.
 - [98] Z. Li, B.H. Tan, T. Lin, C. He, Recent advances in stereocomplexation of enantiomeric PLA-based copolymers and applications, *Prog. Polym. Sci.* 62 (2016) 22–72. doi:10.1016/j.progpolymsci.2016.05.003.
 - [99] J.H. Lee, H.B. Lee, J.D. Andrade, Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces, *Prog. Polym. Sci.* 20 (1995) 1043–1079. doi:10.1016/0079-6700(95)00011-4.
 - [100] F. Kawai, Biodegradation of Polyethers (Polyethylene Glycol, Polypropylene Glycol, Polytetramethylene glycol, and Others), *Biopolym. - Misc. Biopolym. Biodegrad. Polym.* 9 (2005) 267–298. doi:10.1002/3527600035.bpol9012.
 - [101] K. Pielichowski, K. Flejtuch, Differential Scanning Calorimetry Studies on Poly (ethylene Glycol) with Different Molecular Weights for Thermal Energy Storage Materials †, 696 (2003) 690–696. doi:10.1002/pat.276.
 - [102] C. Özdemir, A. Güner, Solubility profiles of poly(ethylene glycol)/solvent systems, I: Qualitative comparison of solubility parameter approaches, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 3068–3093. doi:10.1016/j.eurpolymj.2007.02.022.
 - [103] J.M. Harris, LABORATORY SYNTHESIS OF POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVES, *J. Macromol. Sci. Part C*. 25 (2007) 37–41.
 - [104] J.M. Harris, R.B. Chess, Effect of pegylation on pharmaceuticals., *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 214–221. doi:10.1038/nrd1033.
 - [105] A. Kozłowski, J. Milton Harris, Improvements in protein PEGylation: Pegylated interferons for treatment of hepatitis C, *J. Control. Release.* 72 (2001) 217–224. doi:10.1016/S0168-3659(01)00277-2.
 - [106] A.P. Tiwari, M.K. Joshi, J. Lee, B. Maharjan, S.W. Ko, C.H. Park, C.S. Kim, Heterogeneous electrospun polycaprolactone/polyethylene glycol membranes with improved wettability, biocompatibility, and mineralization, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 520 (2017) 105–113. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.01.054.
 - [107] A. Moriya, P. Shen, Y. Ohmukai, T. Maruyama, H. Matsuyama, Reduction of fouling on poly(lactic acid) hollow fiber membranes by blending with poly(lactic acid)-polyethylene glycol-poly(lactic acid) triblock copolymers, *J. Memb. Sci.* 415–416 (2012) 712–717. doi:10.1016/j.memsci.2012.05.059.
 - [108] S.C.J.G. de A. Perez, S.M.L. Nassif, Efeitos do envelhecimento precoce, polietilenglicol e substratos na viabilidade e vigor de sementes de algarobeira, *Pesqui. Agropecu. Bras.* 33 (1998) 2055–2064.
 - [109] L. Martins, D. Cardoso, Produção de etilenoglicóis e derivados por reações catalíticas do óxido de eteno, *Quim. Nova.* 28 (2005) 264–273. doi:10.1590/S0100-40422005000200018.
 - [110] T. Mainardi, S. Kapoor, L. Bielory, Complementary and alternative medicine: Herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects, *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009) 283–294.e10. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.023.

- [111] C.L. Orsatti, F. Missima, A.C. Pagliarone, T.F. Bachiela, M.C. Búfalo, J.P. Araújo Jr., J.M. Sforcin, Propolis Immunomodulatory Action In Vivo on Toll-Like Receptors 2 and 4 Expression and on Pro-Inflammatory Cytokines Production in Mice, 1146 (2010) 1141–1146. doi:10.1002/ptr.
- [112] J.M. Sforcin, Propolis and the immune system: a review, J. Ethnopharmacol. 113 (2007) 1–14. doi:10.1016/j.jep.2007.05.012.
- [113] S. Castaldo, F. Capasso, Propolis, an old remedy used in modern medicine, Fitoterapia. 73 (2002) 1–6. doi:10.1016/S0367-326X(02)00185-5.
- [114] E.L. Ghisalberti, Propolis: A Review, Bee World. 60 (1979) 59–84. doi:10.1080/0005772X.1979.11097738.
- [115] J.M. Sforcin, V. Bankova, Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?, J. Ethnopharmacol. 133 (2011) 253–260. doi:10.1016/j.jep.2010.10.032.
- [116] L.G. Dias, A.P. Pereira, L.M. Estevinho, Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity, Food Chem. Toxicol. 50 (2012) 4246–4253. doi:10.1016/j.fct.2012.08.056.
- [117] S. de D.A. Ministerio da Agricultura e do Abastecimento, Instrução Normativa nº 3 - Anexo VI, (2001) 1–4. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>.
- [118] S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, Antioxidant activity of propolis of various geographic origins, Food Chem. 84 (2004) 329–339. doi:10.1016/S0308-8146(03)00216-4.
- [119] J.M. Sforcin, A. Fernandes, C.A.M. Lopes, V. Bankova, S.R.C. Funari, Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity, J. Ethnopharmacol. 73 (2000) 243–249. doi:10.1016/S0378-8741(00)00320-2.
- [120] M.S. Regueira, S.R. Tintino, A.R.P. da Silva, M. do S. Costa, A.A. Boligon, E.F.F. Matias, V. de Queiroz Balbino, I.R.A. Menezes, H.D. Melo Coutinho, Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening, Food Chem. Toxicol. (2017). doi:10.1016/j.fct.2017.03.052.
- [121] S. Silici, S. Kutluca, Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region, J. Ethnopharmacol. 99 (2005) 69–73. doi:10.1016/j.jep.2005.01.046.
- [122] L.C.C. Nunes, M.F. de La Roca, K.P. Randau, J.L.S.S.A.M. das G.L.C.P.J. Rolim, Aspetos Legais De Extratos De Própolis Comercializados No Mercado Brasileiro, 89 (2008) 59–63.
- [123] G.M. Sulaiman, K.W. Al Sammarrae, A.H. Ad'hiah, M. Zucchetti, R. Frapolli, E. Bello, E. Erba, M. D'Incalci, R. Bagnati, Chemical characterization of iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials, Food Chem. Toxicol. 49 (2011) 2415–2421. doi:10.1016/j.fct.2011.06.060.
- [124] Y.K. Park, S.M. Alencar, C.L. Aguiar, Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 2502–2506.
- [125] S.M. de Alencar, C.L. de Aguiar, J. Paredes-Guzmán, Y.K. Park, Composição química de Baccharis dracunculifolia, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais, Ciência Rural. 35 (2005) 909–915. doi:10.1590/S0103-84782005000400025.
- [126] B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, S. Simova, M.C. Marcucci, P.L. Miorin, F.D.R. Pasin, I. Tsvetkova, Bioactive constituents of Brazilian red propolis, Evidence-Based Complement. Altern. Med. 3 (2006) 249–254. doi:10.1093/ecam/nel006.
- [127] A. Dausch, C.S. Moraes, P. Fort, Y.K. Park, Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin, Evidence-Based Complement. Altern. Med. 5 (2008) 435–441. doi:10.1093/ecam/nem057.
- [128] C. Ulian, H. Kondrat, T. Cunha, T. Mello, Assimetria de folhas de Dalbergia ecastophyllum (Fabaceae) expostas a estresses ambientais múltiplos na faixa costeira, Ecol. Da Mata Atlântica. (2005) 3.
- [129] M. Vatanparast, B.B. Klitgård, F.A.C.B. Adema, R.T. Pennington, T. Yahara, T. Kajita, First molecular phylogeny of the pantropical genus Dalbergia: Implications for infrageneric circumscription and biogeography, South African J. Bot. 89 (2013) 143–149. doi:10.1016/j.sajb.2013.07.001.
- [130] B.G.C. López, E.M. Schmidt, M.N. Eberlin, A.C.H.F. Sawaya, Phytochemical markers of different types of red propolis, Food Chem. 146 (2014) 174–180. doi:10.1016/j.foodchem.2013.09.063.
- [131] S.M. Alencar, T.L.C. Oldoni, M.L. Castro, I.S.R. Cabral, C.M. Costa-neto, J.A. Cury, P.L. Rosalen, M. Ikegaki, Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis : Red propolis, 113 (2007) 278–283. doi:10.1016/j.jep.2007.06.005.
- [132] I.S.R. Cabral, T.L.C. Oldoni, A. Prado, R.M.N. Bezerra, S.M. De Alencar, M. Ikegaki, P.L. Rosalen, Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira, Quim. Nova. 32 (2009) 1523–1527. doi:10.1590/S0100-40422009000600031.
- [133] Y. gang Shi, Y. Wu, X. yang Lu, Y. ping Ren, Q. Wang, C. min Zhu, D. Yu, H. Wang, Lipase-catalyzed

- esterification of ferulic acid with lauryl alcohol in ionic liquids and antibacterial properties in vitro against three food-related bacteria, *Food Chem.* 220 (2017) 249–256. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.187.
- [134] Y. Zheng, Z. Zhao, L. Fan, S. Meng, C. Song, L. Qiu, P. Xu, J. Chen, Dietary supplementation with rutin has pro-/anti-inflammatory effects in the liver of juvenile GIFT tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Fish Shellfish Immunol.* 64 (2017) 49–55. doi:10.1016/j.fsi.2017.03.014.
- [135] X. Ming, M. Ding, B. Zhai, L. Xiao, T. Piao, M. Liu, Biochanin A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in human umbilical vein endothelial cells, *Life Sci.* 136 (2015) 36–41. doi:10.1016/j.lfs.2015.06.015.
- [136] Y. Peng, Y. Shi, H. Zhang, Y. Mine, R. Tsao, Anti-inflammatory and anti-oxidative activities of daidzein and its sulfonic acid ester derivatives, *J. Funct. Foods.* 35 (2017) 635–640. doi:10.1016/j.jff.2017.06.027.
- [137] S.S. Giri, S.S. Sen, V. Sukumaran, S.C. Park, Pinocembrin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in *Labeo rohita* macrophages via the suppression of the NF- κ B signalling pathway, *Fish Shellfish Immunol.* 56 (2016) 459–466. doi:10.1016/j.fsi.2016.07.038.
- [138] M.H. Castillo, E. Perkins, J.H. Campbell, R. Doerr, J.M. Hassett, C. Kandaswami, E. Middleton, The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin, *Am. J. Surg.* 158 (1989) 351–355. doi:10.1016/0002-9610(89)90132-3.
- [139] S. Kapoor, Luteolin and its inhibitory effect on tumor growth in systemic malignancies, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 777–778. doi:10.1016/j.yexcr.2013.01.006.
- [140] R. Harini, M. Ezhumalai, K.V. Pugalendi, Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, on streptozotocin-diabetic rats, *Eur. J. Pharmacol.* 676 (2012) 89–94. doi:10.1016/j.ejphar.2011.11.051.
- [141] O. Maksymchuk, A. Shysh, I. Rosohatska, M. Chashchyn, QUERCETIN PREVENTS TYPE 1 DIABETIC LIVER DAMAGE THROUGH INHIBITION of CYP2E1, *Pharmacol. Reports.* (2017). doi:10.1016/j.pharep.2017.05.020.
- [142] M. Peng, S. Watanabe, K.W.K. Chan, Q. He, Y. Zhao, Z. Zhang, X. Lai, D. Luo, S.G. Vasudevan, G. Li, Luteolin restricts dengue virus replication through inhibition of the proprotein convertase furin, *Antiviral Res.* 143 (2017) 176–185. doi:10.1016/j.antiviral.2017.03.026.
- [143] J. Koyama, I. Morita, N. Kobayashi, T. Konoshima, M. Takasaki, T. Osakai, H. Tokuda, Correlation between oxidation potentials and inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation of flavonoids, *Cancer Lett.* 263 (2008) 61–66. doi:10.1016/j.canlet.2007.12.016.
- [144] H. Yang, K. Feng, P. Wen, M.-H. Zong, W.-Y. Lou, H. Wu, Enhancing oxidative stability of encapsulated fish oil by incorporation of ferulic acid into electrospun zein mat, *LWT - Food Sci. Technol.* 84 (2017) 82–90. doi:10.1016/j.lwt.2017.05.045.
- [145] S. Roy, S. Mallick, T. Chakraborty, N. Ghosh, A.K. Singh, S. Manna, S. Majumdar, Synthesis, characterisation and antioxidant activity of luteolin-vanadium(II) complex, *Food Chem.* 173 (2015) 1172–1178. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.141.
- [146] C. Faggio, A. Sureda, S. Morabito, A. Sanches-Silva, A. Mocan, S.F. Nabavi, S.M. Nabavi, Flavonoids and platelet aggregation: A brief review, *Eur. J. Pharmacol.* 807 (2017) 91–101. doi:10.1016/j.ejphar.2017.04.009.
- [147] N.C. Cook, S. Samman, Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.* 7 (1996) 66–76. doi:10.1016/S0955-2863(95)00168-9.
- [148] M.L. Falcone Ferreyra, S.P. Rius, P. Casati, Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications, *Front. Plant Sci.* 3 (2012) 1–15. doi:10.3389/fpls.2012.00222.
- [149] D.A. Sampietro, M.M. Sampietro Vattuone, M.A. Vattuone, Immunomodulatory activity of *Apis mellifera* propolis from the North of Argentina, *LWT - Food Sci. Technol.* 70 (2016) 9–15. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.028.
- [150] W. Krol, S. Scheller, Z. Czuba, T. Matsuno, G. Zydowicz, J. Shani, M. Mos, Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components, *J. Ethnopharmacol.* 55 (1996) 19–25. doi:10.1016/S0378-8741(96)01466-3.
- [151] H.A. Rather, R. Thakore, R. Singh, D. Jhala, S. Singh, R. Vasita, Antioxidative study of Cerium Oxide nanoparticle functionalised PCL-Gelatin electrospun fibers for wound healing application, *Bioact. Mater.* 3 (2017) 201–211. doi:10.1016/j.bioactmat.2017.09.006.
- [152] F.R.S. Corrêa, F.S. Schanuel, N. Moura-Nunes, A. Monte-Alto-Costa, J.B. Daleprane, Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NF κ B, *Biomed. Pharmacother.* 86 (2017) 162–171. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.018.
- [153] M. Pérez-Recalde, I.E. Ruiz Arias, É.B. Hermida, Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review, *Phytomedicine.* 38 (2018) 57–65. doi:10.1016/j.phymed.2017.09.024.
- [154] N. Leyva-López, E.P. Gutierrez-Grijalva, D.L. Ambriz-Perez, J. Basilio Heredia, Flavonoids as cytokine

- modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016). doi:10.3390/ijms17060921.
- [155] A. Oryan, E. Alemzadeh, A. Moshiri, Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities, *Biomed. Pharmacother.* 98 (2018) 469–483. doi:10.1016/j.biopha.2017.12.069.
- [156] A.K. Kuropatnicki, E. Szliszka, W. Krol, Historical aspects of propolis research in modern times, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/964149.
- [157] G.A. Burdock, Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis), *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 347–363. doi:10.1016/S0278-6915(97)00145-2.
- [158] A.A. Al Ghamdi, G. Badr, W.N. Hozzein, A. Allam, N.S. Al-Waili, M.A. Al-Wadaan, O. Garraud, Oral supplementation of diabetic mice with propolis restores the proliferation capacity and chemotaxis of B and T lymphocytes towards CCL21 and CXCL12 by modulating the lipid profile, the pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress, *BMC Immunol.* 16 (2015) 1–14. doi:10.1186/s12865-015-0117-9.
- [159] A. Greyce, T. Pessolato, S. Martins, C.E. Ambro, A. Fla, C. Almeida, F. Manc, Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats, 7 (2011). doi:10.1016/j.burns.2011.05.016.
- [160] L.L. V. Batista, E.A. Campesatto, M.L.B. Assis, A.P.F. Barbosa, L.A.M. Grillo, C.B. Dornelas, Estudo comparativo do uso tó pico de própolis verde e vermelha tó pico na reparação de feridas em ratos, *Rev. Col. Bras. Cir.* 39 (2012) 515–520.
- [161] M.V.M. das Neves, Fracionamento biomonitorado da própolis vermelha de Igarassu, Pernambuco, Brasil, Universidade Federal da Paraíba, 2014. <http://tede.biblioteca.ufpb.br/bitstream/tede/6840/1/arquivototal.pdf>.
- [162] V.D.C. SILVA, DESENVOLVIMENTO DE CÁPSULAS DE MICROENCAPSULADOS DA PRÓPOLIS VERMELHA OBTIDOS POR SECAGEM EM SPRAY-DRYING, Universidade Federal de Alagoas, 2016.
- [163] N.C. Nepomuceno, M.A. Barbosa, R.F. Bonan, J.E. Oliveira, F.C. Sampaio, E.S. Medeiros, Antimicrobial activity of PLA/PEG nanofibers containing terpinen-4-ol against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *J. Appl. Polym. Sci.* 135 (2018) 1–9. doi:10.1002/app.45782.
- [164] D.D. da S. Parize, J.E. De Oliveira, M.M. Foschini, J.M. Marconcini, L.H.C. Mattoso, Poly(lactic acid) fibers obtained by solution blow spinning: Effect of a greener solvent on the fiber diameter, *J. Appl. Polym. Sci.* 133 (2016) 1–10. doi:10.1002/app.43379.
- [165] D.D. da S. Parize, M.M. Foschini, J.E. de Oliveira, A.P. Klamczynski, G.M. Glenn, J.M. Marconcini, L.H.C. Mattoso, Solution blow spinning: Parameters optimization and effects on the properties of nanofibers from poly(lactic acid)/dimethyl carbonate solutions, *J. Mater. Sci.* 51 (2016) 4627–4638. doi:10.1007/s10853-016-9778-x.
- [166] R.G.W. RIO, Métodos de controle químico de amostras de própolis, Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1996.
- [167] M.A. Alcântara, Chia (*Salvia hispanica* L.): potencial antioxidante, nutricional e funcional, Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- [168] NCCLS, Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada, Wayne, Pennsylvania, 2002. doi:NCCLS.
- [169] NCCLS, Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada -Sexta Edição, 6a ed., NCCLS document M7-A6, Wayne, Pennsylvania, 2003. http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf (accessed August 18, 2017).
- [170] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 Suppl 1 (2001) 5–16. doi:10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- [171] P.P. Maciel, AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN CONTRA PATÓGENOS ORAIS, Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- [172] R.D. De Castro, E.O. Lima, Anti-candida activity and chemical composition of *cinnamomum zeylanicum* blume essential oil, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 56 (2013) 749–755. doi:10.1590/S1516-89132013000500005.
- [173] H. Wang, L. Hao, P. Wang, M. Chen, S. Jiang, S. Jiang, Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers, *Food Hydrocoll.* 63 (2017) 437–446. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.09.028.
- [174] D.P. Huynh, M.K. Nguyen, B.S. Pi, M.S. Kim, S.Y. Chae, K.C. Lee, B.S. Kim, S.W. Kim, D.S. Lee, Functionalized injectable hydrogels for controlled insulin delivery, *Biomaterials.* 29 (2008) 2527–2534. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.02.016.
- [175] P. Solich, H. Sklenářová, J. Huclová, D. Šatínský, U.F. Schaefer, Fully automated drug liberation apparatus for semisolid preparations based on sequential injection analysis, *Anal. Chim. Acta.* 499 (2003)

- 9–16. doi:10.1016/j.aca.2003.09.002.
- [176] J. Klimundová, K. Mervartová, H. Sklenářová, P. Solich, M. Polášek, Automated sequential injection fluorimetric set-up for multiple release testing of topical formulation, *Anal. Chim. Acta.* 573–574 (2006) 366–370. doi:10.1016/j.aca.2006.04.012.
- [177] L.A. Alves, I.D.A. Freires, T.M. Pereira, A. De Souza, E.D.O. Lima, R.D. De Castro, Effect of *Schinus terebinthifolius* on *Candida albicans* growth kinetics, cell wall formation and micromorphology, *Acta Odontol. Scand.* 71 (2013) 965–971. doi:10.3109/00016357.2012.741694.
- [178] J.M. LIMA, Síntese, caracterização, citotoxicidade e imunomodulação de vidros bioativos dopados com prata em leucócitos humanos, Universidade Federal da Paraíba, 2016.
- [179] Brasil, REGULANIENTO TÉCNICO PARA FIXAÇÃO DE SENTIDADE E QUALIDADE DE PRÓPOLIS, Brasil, 2001.
- [180] M. Namiki, Antioxidants / Antimutagens in Food, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29 (1990) 273–300. doi:10.1080/10408390903044271.
- [181] M. Caroch, P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives, *Trends Food Sci. Technol.* 71 (2018) 107–120. doi:10.1016/j.tifs.2017.11.008.
- [182] M.A. Alenisan, H.H. Alqattan, L.S. Tolbah, A.B. Shori, Antioxidant properties of dairy products fortified with natural additives: A review, *J. Assoc. Arab Univ. Basic Appl. Sci.* 24 (2017) 101–106. doi:10.1016/j.jaubas.2017.05.001.
- [183] G.L.S. Oliveira, Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph: Estudo de revisão, *Rev. Bras. Plantas Med.* 17 (2015) 36–44. doi:10.1590/1983-084X/12_165.
- [184] V. Roginsky, E.A. Lissi, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chem.* 92 (2005) 235–254. doi:10.1016/j.foodchem.2004.08.004.
- [185] I. Hamlaoui, R. Bencheraiet, R. Bensegueni, M. Bencharif, Experimental and theoretical study on DPPH radical scavenging mechanism of some chalcone quinoline derivatives, *J. Mol. Struct.* 1156 (2018) 385–389. doi:10.1016/j.molstruc.2017.11.118.
- [186] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, *Anal. Biochem.* 239 (1996) 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292.
- [187] B.M. Lue, N.S. Nielsen, C. Jacobsen, L. Hellgren, Z. Guo, X. Xu, Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays, *Food Chem.* 123 (2010) 221–230. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.009.
- [188] M. Grzesik, K. Naparło, G. Bartosz, I. Sadowska-Bartos, Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants, *Food Chem.* 241 (2018) 480–492. doi:10.1016/j.foodchem.2017.08.117.
- [189] T.B. Peres, Noções básicas de cromatografia, *Biológico.* 64 (2002) 227–229. http://200.144.6.109/docs/bio/v64_2/peres.pdf.
- [190] M.O. Nafiu, A.A. Hamid, H.F. Muritala, S.B. Adeyemi, Quality Control of Medicinal Plants in Africa, Elsevier Inc., 2017. doi:10.1016/B978-0-12-809286-6/00007-8.
- [191] C.O. da Silva Frozza, C.S.C. Garcia, G. Gambato, M.D.O. de Souza, M. Salvador, S. Moura, F.F. Padilha, F.K. Seixas, T. Collares, S. Borsuk, O.A. Dellagostin, J.A.P. Henriques, M. Roesch-Ely, Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis, *Food Chem. Toxicol.* 52 (2013) 137–142. doi:10.1016/j.fct.2012.11.013.
- [192] T.G. Nascimento, P.F. Silva, L.F. Azevedo, L.G. Rocha, I.C.C. de M.P. Porto, T.F.A. Lima e Moura, I.D. Basílio-Júnior, L.A.M. Grillo, C.B. Dornelas, E.J. da S. Fonseca, E. de J. Oliveira, A.T. Zhang, D.G. Watson, Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity, *Nanoscale Res. Lett.* 11 (2016) 1–16. doi:10.1186/s11671-016-1517-3.
- [193] A. FERNANDES Jr., M.F. SUGIZAKI, M.L. FOGO, S.R.C. FUNARI, C.A.M. LOPES, In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections, *J. Venom. Anim. Toxins.* 1 (1995) 63–69. doi:10.1590/S0104-79301995000200003.
- [194] M.S. Pinto, J.E. De Faria, D. Message, S.T.A. Cassini, C.S. Pereira, M.M. Gioso, Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite, *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38 (2001) 278–283. doi:10.1590/S1413-95962001000600006.
- [195] K.H. Lee, H.Y. Kim, H.J. Bang, Y.H. Jung, S.G. Lee, The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers, *Polymer (Guildf).* 44 (2003) 4029–4034. doi:10.1016/S0032-3861(03)00345-8.
- [196] C. Chen, K. Liu, H. Wang, W. Liu, H. Zhang, Morphology and performances of electrospun polyethylene glycol/poly (dl-lactide) phase change ultrafine fibers for thermal energy storage, *Sol. Energy Mater. Sol.*

- Cells. 117 (2013) 372–381. doi:10.1016/j.solmat.2013.07.001.
- [197] S. Chou, D. Carson, K.A. Woodrow, Current strategies for sustaining drug release from electrospun nano fibers, *J. Control. Release*. 220 (2015) 584–591. doi:10.1016/j.jconrel.2015.09.008.
- [198] A. Toncheva, R. Mincheva, M. Kancheva, N. Manolova, I. Rashkov, P. Dubois, N. Markova, Antibacterial PLA/PEG electrospun fibers: Comparative study between grafting and blending PEG, *Eur. Polym. J.* 75 (2016) 223–233. doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.12.019.
- [199] S. Barud, A. Miguel, D.A. Júnior, S. Saska, L.B. Mestieri, J. Alvares, D. Bonini, R.M. De Freitas, N.U. Ferreira, A.P. Nascimento, F.G. Miguel, M. Mara, D.O. Lima, L. Vaz, E.A. Barizon, F. Marquele-oliveira, A. Maria, M. Gaspar, S. José, L. Ribeiro, A.A. Berretta, Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing, 2013 (2013).
- [200] M. Kmietek, D. Bieliński, M. Piotrowska, Propolis as an antidegradant and biocidal agent for natural rubber, *J. Appl. Polym. Sci.* 135 (2018) 1–9. doi:10.1002/app.45911.
- [201] H. Zhang, Y. Fu, F. Niu, Z. Li, C. Ba, B. Jin, G. Chen, X. Li, Enhanced antioxidant activity and in vitro release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan, *Food Hydrocoll.* (2018). doi:10.1016/j.foodhyd.2018.02.019.
- [202] K.R. Morris, G.T. Knipp, A.T.M. Serajuddin, Structural Properties of Polyethylene Glycol-Polysorbate 80 Mixture, a Solid Dispersion Vehicle, *J. Pharm. Sci.* 81 (1992) 1185–1188. doi:10.1002/jps.2600811212.
- [203] J.E. Oliveira, L.H.C. Mattoso, W.J. Orts, E.S. Medeiros, Structural and Morphological Characterization of Micro and Nanofibers Produced by Electrospinning and Solution Blow Spinning: A Comparative Study, 2013 (2013).
- [204] J.E. Oliveira, E.S. Medeiros, L. Cardozo, F. Voll, E.H. Madureira, L.H.C. Mattoso, O.B.G. Assis, Development of poly(lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals, *Mater. Sci. Eng. C*. 33 (2013) 844–849. doi:10.1016/j.msec.2012.10.032.
- [205] K.M. Tohamy, M. Mabrouk, I.E. Soliman, H.H. Beherei, M.A. Aboelnasr, Novel alginate/hydroxyethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffold for bone regeneration: In vitro cell viability and proliferation of human mesenchymal stem cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 112 (2018) 448–460. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.181.
- [206] E.C. Silva, M.V.R.V. Paola, J. do R. Matos, Análise térmica aplicada à cosmetologia, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 43 (2007) 10. <http://www.scielo.br/pdf/rbcb/v43n3/a04v43n3.pdf>.
- [207] A.H. Matsuda, L.B. Machado, N.L. Del Mastro, Thermal analysis applied to irradiated propolis, *Radiat. Phys. Chem.* 63 (2002) 353–355. doi:10.1016/S0969-806X(01)00524-2.
- [208] S. Han, C. Kim, D. Kwon, Thermal/oxidative degradation and stabilization of polyethylene glycol, *Polymer (Guildf)*. 38 (1997) 317–323. doi:10.1016/S0032-3861(97)88175-X.
- [209] J. Glastrup, Degradation of polyethylene glycol. A study of the reaction mechanism in a model molecule: Tetraethylene glycol, *Polym Degrad Stab.* 52 (1996) 217–222. doi:10.1016/0141-3910(95)00225-1.
- [210] S.K. Kwon, D.H. Kim, Effect of Process Parameters of UV-Assisted Gas-Phase Cleaning on the Removal of PEG (Polyethyleneglycol) from a Si Substrate, *J. Korean Phys. Soc.* 49 (2006) 1421–1427.
- [211] I. Acar, G.S. Pozan, S. Özgümüş, Thermal Oxidative Degradation Kinetics and Thermal Properties of Poly(ethylene terephthalate) Modified with Poly(lactic acid), *Polym. Polym. Compos.* 109 (2007) 2747–2755. doi:10.1002/app.
- [212] V.P. Sajna, S. Mohanty, S.K. Nayak, A study on thermal degradation kinetics and flammability properties of poly(lactic acid)/banana fiber/nanoclay hybrid bionanocomposites, *Polym. Compos.* 38 (2017) 2067–2079. doi:10.1002/pc.23779.
- [213] E. Ozdemir, J. Hacaloglu, Characterizations of PLA-PEG blends involving organically modified montmorillonite, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 127 (2017) 343–349. doi:10.1016/j.jaap.2017.07.016.
- [214] E. Ozdemir, T. Tinçer, J. Hacaloglu, Characterization of polylactide/poly(ethylene glycol) blends via direct pyrolysis mass spectrometry, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 122 (2016) 315–322. doi:10.1016/j.jaap.2016.09.010.
- [215] I.G. Athanasoulia, P.A. Tarantili, Preparation and characterization of polyethylene glycol/poly(L-lactic acid) blends, *Pure Appl. Chem.* 89 (2017) 141–152. doi:10.1515/pac-2016-0919.
- [216] A.K. Mohapatra, S. Mohanty, S.K. Nayak, Effect of PEG on PLA/PEG Blend and Its Nanocomposites: A Study of Thermo-Mechanical and Morphological Characterization Aswini, *Polym. Compos.* 35 (2014) 283–293. doi:10.1002/pc.
- [217] V. Bankova, M. Popova, B. Trusheva, Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: A review, *Chem. Cent. J.* 8 (2014) 1–8. doi:10.1186/1752-153X-8-28.
- [218] L.C.C. Nunes, A.B. Galindo, A.D.S.O. De Deus, D. Arcanjo Rufino, K.P. Randau, H.S. Xavier, A.M.D.G.L. Citó, P.J.R. Neto, Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*, *Brazilian J. Pharmacogn.* 19 (2009) 524–529. doi:10.1590/S0102-

- 695X2009000400003.
- [219] Â. Sena-Lopes, F.S.B. Bezerra, R.N. das Neves, R.B. de Pinho, M.T. de Oliveira Silva, L. Savegnago, T. Collares, F. Seixas, K. Begnini, J.A.P. Henriques, M.R. Ely, L.C. Rufatto, S. Moura, T. Barcellos, F. Padilha, O. Dellagostin, S. Borsuk, Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis, *PLoS One*. 13 (2018) 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0191797.
 - [220] R.N.S. Torres, J.A.D. Lopes, J.M.M. Neto, A.M.D.G.L. Cit, Constituintes voláteis de própolis Piauiense, *Quim. Nova*. 31 (2008) 479–485. doi:10.1590/S0100-4042200800030000.
 - [221] N.A. Santos, S.S. Damasceno, P.H.M. De Araújo, V.C. Marques, R. Rosenhaim, V.J. Fernandes, N. Queiroz, I.M.G. Santos, A.S. Maia, A.G. Souza, Caffeic acid: An efficient antioxidant for soybean biodiesel contaminated with metals, *Energy and Fuels*. 25 (2011) 4190–4194. doi:10.1021/ef200869v.
 - [222] S.S. Damasceno, Avaliação da Atividade Antioxidante dos Ácidos Cafêico e Ferúlico no Controle da Estabilidade Oxidativa do Biodiesel de Soja, Universidade Federal da Paraíba, 2011. http://security.ufpb.br/ppgq/contents/documentos/teses-e-dissertacoes/dissertacoes/2011/Dissertacao_Sarah_S_Damasceno.pdf.
 - [223] S. Huang, C.-P. Zhang, K. Wang, G. Li, F.-L. Hu, Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis, *Molecules*. 19 (2014) 19610–19632. doi:10.3390/molecules191219610.
 - [224] S.S. COSTA, Filmes de fécula de mandioca e glicerol, reforçados com nanocelulose e ativados com própolis vermelha, Universidade Federal da Bahia, 2013. http://www.pgalimentos.far.ufba.br/sites/pgalimentos.far.ufba.br/files/dissertacao_samantha_costa.pdf.
 - [225] M.P. Arrieta, J. López, D. López, J.M. Kenny, L. Peponi, Biodegradable electrospun bionanocomposite fibers based on plasticized PLA–PHB blends reinforced with cellulose nanocrystals, *Ind. Crops Prod.* 93 (2016) 290–301. doi:10.1016/j.indcrop.2015.12.058.
 - [226] I. Spiridon, R. Nicoleta, H. Kangas, Influence of fiber modifications on PLA / fiber composites. Behavior to accelerated weathering, 92 (2016). doi:10.1016/j.compositesb.2016.02.032.
 - [227] a. P. Luz, S. Ribeiro, V.C. Pandolfelli, Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários, *Cerâmica*. 54 (2008) 174–183. doi:10.1590/S0366-69132008000200007.
 - [228] M. Popova, H. Lazarova, B. Trusheva, M. Popova, V. Bankova, J. Mihály, H. Najdenski, I. Tsvetkova, Á. Szegedi, Nanostructured silver silica materials as potential propolis carriers, *Microporous Mesoporous Mater.* 263 (2018) 28–33. doi:10.1016/j.micromeso.2017.11.043.
 - [229] Y. Soleimani, S.A.H. Goli, J. Varshosaz, S.M. Sahafi, Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil, *Food Chem.* 244 (2018) 83–92. doi:10.1016/j.foodchem.2017.10.010.
 - [230] B.C.B.D.S. Mello, J.C.C. Petrus, M.D. Hubinger, Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração, *Ciência e Tecnol. Aliment.* 30 (2010) 166–172. doi:10.1590/S0101-20612010000100025.
 - [231] E.K. Soltani, R. Cerezuela, N. Charef, S. Mezaache-Aichour, M.A. Esteban, M.M. Zerroug, Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses, *Fish Shellfish Immunol.* 62 (2017) 57–67. doi:10.1016/j.fsi.2017.01.009.
 - [232] T. Yamaoka, E. Njatawidjaja, A. Kasai, C.A. Agudelo, T. Ehashi, S. Kakinoki, S. Kato, A. Mahara, Elastic/adhesive double-layered PLA-PEG multiblock copolymer membranes for postoperative adhesion prevention, *Polym. Degrad. Stab.* 98 (2013) 2168–2176. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2013.08.026.
 - [233] R. Scaffaro, F. Lopresti, A. Maio, L. Botta, S. Rigogliuso, G. Gherzi, Composites : Part A Electrospun PCL / GO-g-PEG structures : Processing-morphology- properties relationships, 92 (2017) 97–107.
 - [234] A. El-Fiqi, J.H. Kim, H.W. Kim, Osteoinductive fibrous scaffolds of biopolymer/mesoporous bioactive glass nanocarriers with excellent bioactivity and long-term delivery of osteogenic drug, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7 (2015) 1140–1152. doi:10.1021/am5077759.
 - [235] Q. Wei, F. Xu, X. Xu, X. Geng, L. Ye, A. Zhang, Z. Feng, The multifunctional wound dressing with core-shell structured fibers prepared by coaxial electrospinning, *Front. Mater. Sci.* 10 (2016) 113–121. doi:10.1007/s11706-016-0339-7.
 - [236] K. Moomand, L.-T. Lim, Oxidative stability of encapsulated fish oil in electrospun zein fibres, *Food Res. Int.* 62 (2014) 523–532. doi:10.1016/j.foodres.2014.03.054.
 - [237] Y.P. Neo, S. Ray, J. Jin, M. Gizdavic-Nikolaidis, M.K. Nieuwoudt, D. Liu, S.Y. Quek, Encapsulation of food grade antioxidant in natural biopolymer by electrospinning technique: A physicochemical study based on zein-gallic acid system, *Food Chem.* 136 (2013) 1013–1021. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.010.
 - [238] M. Roussaki, A. Gaitanarou, P.C. Diamanti, S. Vouyiouka, C. Papaspyrides, P. Kefalas, A. Detsi, Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles, *Polym. Degrad.*

- Stab. 108 (2014) 182–187. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.08.004.
- [239] K. Adamska, A. Voelkel, A. Berlińska, The solubility parameter for biomedical polymers—Application of inverse gas chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127 (2016) 202–206. doi:10.1016/j.jpba.2016.04.014.
- [240] K.A. Gebru, C. Das, Effects of solubility parameter differences among PEG, PVP and CA on the preparation of ultrafiltration membranes: Impacts of solvents and additives on morphology, permeability and fouling performances, *Chinese J. Chem. Eng.* 25 (2017) 911–923. doi:10.1016/j.cjche.2016.11.017.
- [241] M. Meunier, A. Goupil, P. Lienard, Predicting drug loading in PLA-PEG nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 526 (2017) 157–166. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.04.043.
- [242] A.L. dos Santos, D.O. Santos, C.C. de Freitas, B.L.A. Ferreira, I.F. Afonso, C.R. Rodrigues, H.C. Castro, *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar, *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 43 (2007) 413–423. doi:10.1590/S1676-24442007000600005.
- [243] L.M. Sales, T.M. da Silva, *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE: UM DESAFIO PARA A SAÚDE PÚBLICA, *Acta Biomédica Bras.* 3 (2012) 1–13.
- [244] M.F.P. Lima, M.A. Borges, R.S. Parente, R.C.V. Júnior, M.E. De Oliveira, *Staphylococcus aureus* E AS INFECÇÕES HOSPITALARES – REVISÃO DE LITERATURA, *Uningá.* 21 (2015) 32–39. <http://www.mastereditora.com.br/review>.
- [245] J. Santiago-Morales, G. Amariei, P. Letón, R. Rosal, Antimicrobial activity of poly(vinyl alcohol)-poly(acrylic acid) electrospun nanofibers, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 146 (2016) 144–151. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.04.052.
- [246] M. Dias Antunes, G. da Silva Dannenberg, Â.M. Fiorentini, V.Z. Pinto, L.T. Lim, E. da Rosa Zavareze, A.R.G. Dias, Antimicrobial electrospun ultrafine fibers from zein containing eucalyptus essential oil/cyclodextrin inclusion complex, *Int. J. Biol. Macromol.* 104 (2017) 874–882. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.095.
- [247] L. Lin, Y. Dai, H. Cui, Antibacterial poly(ethylene oxide) electrospun nanofibers containing cinnamon essential oil/beta-cyclodextrin proteoliposomes, *Carbohydr. Polym.* 178 (2017) 131–140. doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.043.
- [248] Y. He, W.R. Wang, J.D. Ding, Effects of L-lactic acid and D,L-lactic acid on viability and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Chinese Sci. Bull.* 58 (2013) 2404–2411. doi:10.1007/s11434-013-5798-y.
- [249] S.O. Rogero, A.B. Lugão, T.I. Ikeda, Á.S. Cruz, Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, *Mater. Res.* 6 (2003) 317–320. doi:10.1590/S1516-14392003000300003.
- [250] A. Escudero-Castellanos, B.E. Ocampo-García, M.V. Domínguez-García, J. Flores-Estrada, M. V. Flores-Merino, Hydrogels based on poly(ethylene glycol) as scaffolds for tissue engineering application: biocompatibility assessment and effect of the sterilization process, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 27 (2016). doi:10.1007/s10856-016-5793-3.
- [251] J. Bergsma, W.C. Bruijn, F.R. Rozema, R.R.M. Bos, G. Boering, Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws, *Biomaterials.* 16 (1995) 25–31. doi:10.1016/0142-9612(95)91092-D.
- [252] T.F. Bachiega, C.L. Orsatti, A.C. Pagliarone, J.M. Sforcin, The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages, 1313 (2012) 1308–1313. doi:10.1002/ptr.3731.
- [253] A. Prigione, B. Begni, A. Galbusera, S. Beretta, L. Brighina, R. Garofalo, S. Andreoni, R. Piolti, C. Ferrarese, Oxidative stress in peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease: Negative correlation with levodopa dosage, *Neurobiol. Dis.* 23 (2006) 36–43. doi:10.1016/j.nbd.2006.01.013.
- [254] R. Mittler, ROS Are Good, *Trends Plant Sci.* 22 (2017) 11–19. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- [255] P. Nordenfelt, H. Tapper, Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 90 (2011) 271–284. doi:10.1189/jlb.0810457.
- [256] C.F. Urban, J.E. Nett, Neutrophil extracellular traps in fungal infection, *Semin. Cell Dev. Biol.* (2018) 1–11. doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.020.
- [257] C.A. Janeway, P. Travers, M. Walport, M. Shlomchik, *Immunobiology: the immune system in health and disease*, 5th ed., Garland Pub, New York, 2001. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/> (accessed July 20, 2018).
- [258] N. Cotelle, Role of flavonoids in oxidative stress., *Curr. Top. Med. Chem.* 1 (2001) 569–590. doi:10.2174/1568026013394750.
- [259] A.L.B.S. Barreiros, J.M. David, J.P. David, Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo, *Quim. Nova.* 29 (2006) 113–123. doi:10.1590/S0100-40422006000100021.

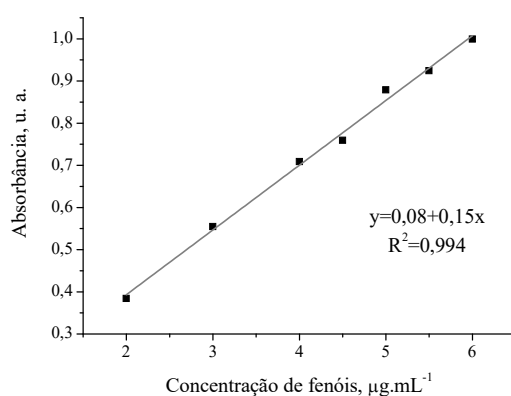
- [260] C.D.S. e A.R. de Oliveira, Radicais livres de O₂ e ex. mecanismos de formação e adaptação ao treino, *Rev. Bras. Med. Do Esporte*. 10 (2004) 308–316. doi:10.1590/S1517-86922004000400008.
- [261] K.F. Santos Ricardo, T.T. De Oliveira, T.J. Nagem, A. Da Silva Pinto, M.G.A. Oliveira, J.F. Soares, Effect of flavonoids morin; quercetin and nicotinic acid on lipid metabolism of rats experimentally fed with triton, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 44 (2001) 263–267.
- [262] D. Granato, D.S. Nunes, *Análises Químicas, Propriedades Funcionais e Controle de Qualidade de ...* - Daniel Granato, Domingos Nunes - Google Livros, 1a ed., Elsevier Editora Ltda., Rio de Janeiro, 2016. <https://books.google.com.br/books?id=2LA4DwAAQBAJ&pg=PT233&lpg=PT233&dq=ação+quelante+de+oxigenio+singlete&source=bl&ots=D7Akjfh59k&sig=GglDUbbKOGj94oWKGn49tlnzfhs&hl=pt-BR&sa=X&ved=0ahUKEwjJsqqB3KjcAhUO2FMKHRPrD4UQ6AEIbTAG#v=onepage&q=a%25C3%25A7%25C> (accessed July 20, 2018).
- [263] R.M. Gonzaga, Efeito do resveratrol sobre a produção de ROS, óxido nítrico e VEGF por leucócitos de pacientes diabéticos tipo 2, Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Belo Horizonte, 2013.
- [264] X. Sheng, L. Fan, C. He, K. Zhang, X. Mo, H. Wang, Vitamin E-loaded silk fibroin nanofibrous mats fabricated by green process for skin care application, *Int. J. Biol. Macromol.* 56 (2013) 49–56. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.01.029.
- [265] S. Lin, M. Chen, H. Jiang, L. Fan, B. Sun, F. Yu, X. Yang, X. Lou, C. He, H. Wang, Green electrospun grape seed extract-loaded silk fibroin nanofibrous mats with excellent cytocompatibility and antioxidant effect, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 139 (2016) 156–163. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.12.001.
- [266] J.-M. Zhang, J. An, Cytokines, Inflammation and Pain, *Int. Anesthesiol. Clin.* 45 (2007) 27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- [267] M.B. de O. Oliveira, R.K. Sakata, A.M. Issy, L.R. Gerola, R. Salomão, Citocinas e Dor, *Rev. Bras. Anesthesiol.* 61 (2011) 255–265. <http://www.scielo.br/pdf/rba/v61n2/v61n2a14.pdf> (accessed January 28, 2019).
- [268] B. Bueno-Silva, D. Kawamoto, E.S. Ando-Sugimoto, S.M. Alencar, P.L. Rosalen, M.P.A. Mayer, Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in lps-activated macrophages, *PLoS One*. 10 (2015) 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0144954.
- [269] T.F. Bachiega, C.L. Orsatti, A.C. Pagliarone, J.M. Sforcin, The Effects of Propolis and its Isolated Compounds on Cytokine Production by Murine Macrophages, 1313 (2012) 1308–1313.
- [270] M.G. Dehne, A. Sablotzki, A. Hoffmann, J. Mühling, F.E. Dietrich, G. Hempelmann, Alterations of acute phase reaction and cytokine production in patients following severe burn injury, *Burns*. 28 (2002) 535–542. doi:10.1016/S0305-4179(02)00050-5.
- [271] R.M. Sherry, J.I. Cue, J.K. Goddard, J.B. Parramore, J.T. DiPiro, Interleukin-10 Is Associated with the Development of Sepsis in Trauma Patients, *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care*. 40 (1996) 613–617. doi:10.1097/00005373-199604000-00016.
- [272] A. Lyons, J.L. Kelly, M.L. Rodrick, J.A. Mannick, J.A. Lederer, Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection, *Ann. Surg.* 226 (1997) 450–460. doi:10.1097/00000658-199710000-00006.
- [273] A.P.M. Serezani, G. Bozdogan, S. Sehra, D. Walsh, P. Krishnamurthy, E.A. Sierra Potchanant, G. Nalepa, S. Goenka, M.J. Turner, D.F. Spandau, M.H. Kaplan, IL-4 impairs wound healing potential in the skin by repressing fibronectin expression, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (2017) 142–151.e5. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.012.
- [274] Y. Zhao, L. Bao, L.S. Chan, L.A. DiPietro, L. Chen, Correction: Aberrant wound healing in an epidermal interleukin-4 transgenic mouse model of atopic dermatitis, *PLoS One*. 11 (2016) 1–17. doi:10.1016/j.juro.2016.12.029.
- [275] Q. Hamid, M. Boguniewicz, D.Y.M. Leung, Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis, *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 870–876. doi:10.1172/JCI117408.

APÊNDICE

Seção 1. Curva analítica de teor de fenóis totais

A curva foi obtida através do método Folin-Ciaocalteau no comprimento de onda de 760 nm (Figura A0-1). Cada concentração foi realizada em triplicata.

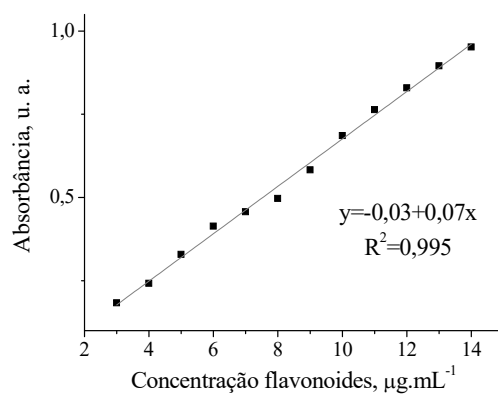
Figura A0-1. Curva analítica dos fenóis totais



Seção 2. Curva analítica de teor de flavonoides totais

A curva analítica para determinação de flavonoides totais foi obtida através do marcador quercetina (Figura A0-2) no comprimento de onda 425 nm. Cada concentração foi realizada em triplicata.

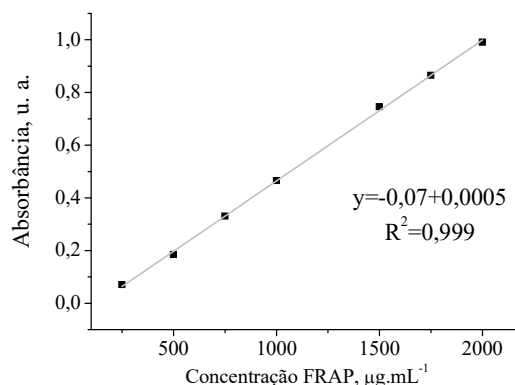
Figura A0-2. Curva analítica dos flavonoides totais



Seção 3. Curva analítica da atividade antioxidante por FRAP

A Figura A0-3 mostra a curva analítica da atividade antioxidante pela redução do FRAP. Cada concentração foi realizada em triplicata.

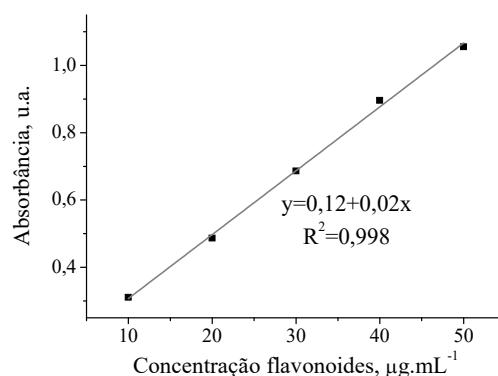
Figura A0-3. Curva analítica dos flavonoides totais



Seção 4. Curva analítica de flavonoides totais por dissolução

A curva analítica dos flavonoides totais por dissolução foi realizada no comprimento de onda de 280 nm, cujas aplicações foram para determinação de PV adsorvida na superfície da fibra, na eficiência de encapsulamento e na liberação controlada da PV (Figura A4). Cada concentração foi realizada em triplicata.

Figura A0-4. Curva analítica dos flavonoides totais por dissolução



Seção 5. Certificado de Apresentação para Apreciação Ética do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPB

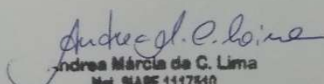


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS/UFPB aprovou em *AD REFERENDUM*, face à exiguidade de tempo, o Projeto de Pesquisa intitulado: “DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PARA TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS À BASE DE FIBRAS DE PLA/PEG E PROPOLIS VERMELHA PRODUZIDAS POR SOLUTION BLOW SPINNING”, da pesquisadora Rebeca Tibau Aguiar Dias. CAAE: 88942218.0.0000.5188.

João Pessoa, 07 de maio de 2018.


Andreia Márcia de C. Lima
Mat. SIAPE 1117810
Secretária do CEP-CCS-UFPB

Seção 5. Imagens macroscópicas das fibras**Figura A0-5. Fotografias das mantas de PLA/PEG sem e com PV**

Seção 6. Plaqueamento da cinética de inibição de *S. aureus*

A Figura A0-6 mostra o resultado do plaqueamento das alíquotas de inóculo em contato com PV e as mantas incorporadas com 16% m/m PV. A partir da contagem destas colônias que foram calculadas o $\log_{10}$ das UFC.mL⁻¹ seguido da porcentagem de inibição.

Figura A0-6. Unidades de colonias formadas pelo *S. aureus* em contato com as fibras

