



RENORBIO

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PADRONIZACAO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMEMBRANA
INCORPORADA COM EXTRATO DE *Chenopodium ambrosioides* L.
(Mastruz) ASSOCIADO AO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS DE
Apis melifera (EPP-AF®)**

São Luís, MA

2022



MARLA RAQUEL PONTES DA ROCHA

**PADRONIZACAO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMEMBRANA
INCORPORADA COM EXTRATO DE *Chenopodium ambrosioides* L.
(Mastruz) ASSOCIADO AO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS DE
Apis melifera (EPP-AF®)**

Tese apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

São Luís, MA

2022



FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE TESE

ALUNA: Marla Raquel Pontes da Rocha

TÍTULO DO PROJETO: PADRONIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOMEMBRANA INCORPORADA COM EXTRATO DE *Chenopodium ambrosioides* L. (Mastruz) ASSOCIADO AO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* (EPPAF®).

PROFESSORA ORIENTADORA: Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profª. Drª. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento – UFMA (Presidente)	___Satisfatório___	_____
Prof. Dr. Lívio Martins Costa Júnior – UFMA (Titular)	___Satisfatório___	_____
Profª. Drª. Marcia Cristina Goncalves Maciel – UNB (Titular)	___Satisfatório___	_____
Prof. Dr. Eduardo Martins De Souza – UNICEUMA (Titular)	___Satisfatório___	_____
Prof. Dr. Aramys Silva Dos Reis – UFMA (Titular)	___Satisfatório___	_____

DATA DA APROVAÇÃO: 4 de novembro de 2022

HORÁRIO: 14:00h

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

PONTES DA ROCHA, MARLA RAQUEL.

CARACTERIZAÇÃO DE BIOMEMBRANAS INCORPORADAS COM EXTRATO DE *Chenopodium ambrosioides* L. ASSOCIADO AO EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS DE APIS MELIFERA EPP-AF® PARA APLICAÇÃO EM FERIDAS / MARLA RAQUEL PONTES DA ROCHA. - 2022.

101 p.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2022.

1. Antibacteriano. 2. Biomembrana de celulose bacteriana. 3. Cicatrização. 4. Mastruz. 5. Própolis EPP-AF®. I. Fernandes do Nascimento, Prof^a. Dr^a Flávia Raquel. II. Título.

“Mar calmo não faz bons marinheiros”

(autor desconhecido)

Ao meu pai, Hércules Villar da Rocha, que
sempre foi o maior incentivador nos meus estudos!

(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço à Providência Divina que me permitiu chegar até aqui, pois a partir do ano da minha entrada no Doutorado (2018) foram muitos os desafios, especialmente, o ano de 2020 quando, como muitos brasileiros, tive perdas dolorosas... mas apesar disso, continuei... e agradeço por ter sido conectada com pessoas e eventos que contribuíram, significativamente, com esse resultado.

Bom, a lista de agradecimentos é bem extensa... vamos lá!

À minha família, mãe e irmã que, apesar da distância, sempre estivemos juntas e puderam seguir firmes e fortes quando não pude estar presente... Ao meu pai (*in memoriam*), que infelizmente, não está aqui... foram as lembranças de suas palavras que me fizeram sempre continuar, pois muitas foram as dificuldades e por várias vezes pensei em desistir!

Às minhas tias Lelé, Ladilce e Linda (*in memoriam*), que sempre estiveram por perto da minha mãe e irmã nos momentos de alegrias e tristezas. Também agradeço aos meus primos Laio, Helen e Heloise (Isinha), sempre –muito parceiros, seja na hora de curtir os bons momentos da vida ou naqueles nada bons!

À Emanuelle, minha parceira de aventuras e desventuras, esposa, namorada ou eterna namorada, como ela prefere. Agradeço por todo o apoio, e por ter “aguentado” as minhas oscilações de humor durante esse período rsrs! Não posso deixar de mencionar os meus “piquituxos”, o Midas e a Dyjaa meus filhos de quatro patas, que estiveram presentes nesses momentos solitários de escrita da tese. Companheiros fiéis, foram minha fonte de inspiração rsrs!

Aos meus familiares maranhenses rsrs, Eli, Manoel, Andressa, Seu Manoel e D.Jane, são pessoas que também me ajudaram a continuar, sempre estiveram presentes, seja em momentos bons ou ruins!

À minha orientadora Profa. Dra. Flávia Nascimento que, em uma bela tarde chuvosa, me recebeu e comprou a minha “ideia” e assim, submeti a proposta do projeto de tese...o caminho não foi tão simples assim. No decorrer do doutorado, de vez em quando, recebia uns puxões de orelha, porque confesso que, às vezes, sou teimosa, porém, só tenho a dizer: obrigada Profa. Flávia por toda a oportunidade concedida!

Aos Laboratórios de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão – LIF/UFMA, Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer-LIAC/UFMA e ao Laboratório de Patologia e Imunopatologia - LPI/UFMA, que disponibilizaram as suas estruturas para a realização dos experimentos. Obrigada professoras: Rosane Guerra, Ana Paula Azevedo e Lucilene Amorim Silva pela colaboração.

Vale um agradecimento especial à Profa. Rosane e à Profa. Ana Paula pelas conversas científicas, que puderam nutrir a minha imaginação nos experimentos.

Não posso deixar de dizer que, no caminho conheci pessoas maravilhosas com quem pude criar laços de amizade, com destaque especial à Sulayne e ao André que são anjos na sua forma humana e que juntos, em muitos momentos, filosofamos sobre a vida... fico sem palavras para descrever toda a ajuda concedida pela Sulayne na realização dos experimentos com células! Ao Regis que também foi de fundamental importância nos testes antimicrobianos! Também não posso deixar de mencionar o Jefferson, Andressa, Alex, Luana, Ana e a D. Fátima sempre muito colaborativos e atenciosos.

À Coordenação de Prospecção e Redação de Patentes (CPRP) da Diretoria de Pesquisa e Inovação Tecnológica (DPIT) da Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa, Pós-Graduação e Internacionalização (AGEUFMA), pelas orientações na redação da patente.

Ao Prof. Dr. Eduardo Almeida, curador do Herbário do Maranhão pela identificação da espécie vegetal.

Ao Prof. Dr. Hernane Barud, do Laboratório de Biopolímeros da Universidade de Araraquara – BIOPOLMAT onde fui muito bem recebida por ele

e sua equipe e obtive auxílio na elaboração das biomembranas (Amanda, Guilherme, Lucas..., posteriormente, com a Victória nas análises por FT-IR /TG. Se eu esqueci alguém, desculpe-me, não foi por maldade rsrs!).

À Dra. Andresa Berreta e à equipe do Laboratório P&D da Apis Flora, que também foram muito atenciosos em colaborar com a minha tese, sendo suas contribuições fundamentais com as formulações dos extratos.

À FAPEMA pelo auxílio financeiro ao projeto e pela bolsa concedida.

Ao, RENORBIO, UFMA, UNIARA, APIS FLORA e a todos que contribuíram direta e indiretamente com esse trabalho.

Agradeço aos momentos de dificuldade, seja com ocorrências e/ou pessoas que cruzaram o meu caminho durante esse período, pois tais circunstâncias só trouxeram fortalecimento para o caminhar da minha jornada!!!

RESUMO

A produção de biomembranas como biocurativos, tem sido objeto de interesse da indústria farmacêutica por conta dos seus efeitos cicatrizantes e antissépticos, principalmente no tratamento de feridas crônicas que apresentam grande impacto socioeconômico. O uso de produtos naturais incorporados nas biomembranas, ultimamente vem sendo investigado pelo potencial biológico e pela possibilidade de liberação lenta. Nosso grupo de pesquisa tem estudado *Chenopodium ambrosioides* e o extrato padronizado de própolis de *Apis mellifera* (EPP-AF®) no tratamento de inflamações e feridas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir, caracterizar e testar atividades antimicrobiana e cicatrizante *in vitro* biomembranas incorporadas com extrato de folhas de *C. ambrosioides* (Mastruz) associado ou não ao EPP-AF® para potencial uso como biocurativo. Para tanto, os métodos empregados foram categorizados em testes *in vitro* de atividade biológica (teste de citotoxicidade dos extratos; testes de antissepsia e de cicatrização das biomembranas) e análises físico-químicas (caracterização macroscópicas das biomembranas; espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR); análise térmica por termogravimetria (TG)). Foram obtidos biocurativos com biomembranas de celulose bacteriana incorporadas ao: extrato de *C. ambrosioides* (0,05 mg/mL) - G1 ao ; EPP-AF® (0,024 mg/mL) G2 – ao e ao extrato de *C. ambrosioides* associado ao EPP-AF® (0,074 mg/mL) - G3. O biocurativo G1 não apresentou atividade antibacteriana, enquanto o biocurativo G2 e G3 apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923; Nos ensaios de cicatrização *in vitro*, os fibroblastos apresentaram melhor adesão a biomembrana G1, do que a biomembrana G2; Os Ensaios de citotoxicidade por MTT foram realizados em fibroblastos, considerando os extratos de *C. ambrosioides*, EPP-AF® e suas associações, sendo então, a proliferação celular observada nas concentrações entre 7 e 1000 µg/mL. Os dados permitem concluir que os biocurativos compostos de biomembranas com extratos de mastruz e EPP-AF®, possuem potencial para integrar a terceira geração de biocurativos em amplo desenvolvimento, uma vez que, essa associação favoreceu os seus principais efeitos terapêuticos, como cicatrizante e antibacteriano em um alvo comum, ou seja, é um biomaterial de alta compatibilidade biológica, com aspectos de reprodutibilidade aliado aos custos de biofuncionalidade, pois estes critérios constituem na maior preocupação no processo produtivo do setor industrial, e especialmente, nos produtos voltados para a saúde.

Palavras-Chaves: Biomembrana de celulose bacteriana; Antibacteriano; Cicatrização; Mastruz; EPP-AF®

ABSTRACT

The production of biomembranes as biodressings has been the object of interest of the pharmaceutical industry due to their healing and antiseptic effects, mainly in the treatment of chronic wounds that have a great socioeconomic impact. The use of natural products incorporated into biomembranes has lately been investigated for their biological potential and the possibility of slow release. Our research group has studied *Chenopodium ambrosioides* and the standardized extract of *Apis mellifera* propolis (EPP-AF®) in the treatment of inflammation and wounds. Thus, the aim of this work was to produce, characterize and test in vitro antimicrobial and wound healing activities biomembranes incorporated with *C. ambrosioides* (Mastruz) leaf extract associated or not with EPP-AF® for potential use as a biodressing. For this purpose, the methods employed were categorized into in vitro tests of biological activity (cytotoxicity test of extracts; antiseptics and healing tests of biomembranes) and physicochemical analyzes (macroscopic characterization of biomembranes; infrared spectroscopy by Fourier transform (FT-IR); thermal analysis by thermogravimetry (TG)). Biodressings were obtained with bacterial cellulose biomembranes incorporated into: *C. ambrosioides* extract (0.05 mg/mL) - G1 ao ; EPP-AF® (0.024 mg/mL) G2 – with and to the extract of *C. ambrosioides* associated with EPP-AF® (0.074 mg/mL) - G3. Biodressing G1 did not show antibacterial activity, while biodressing G2 and G3 showed antibacterial activity against *S. aureus* ATCC 25923; In in vitro healing assays, fibroblasts showed better adhesion to G1 biomembrane than to G2 biomembrane; The MTT cytotoxicity assays were carried out in fibroblasts, considering the extracts of *C. ambrosioides*, EPP-AF® and their associations, being then, the cellular proliferation observed in the concentrations between 7 and 1000 µg/mL. The data allow us to conclude that the biobandages composed of biomembranes with mastruz extracts and EPP-AF®, have the potential to integrate the third generation of biobandages in wide development, since this association favored their main therapeutic effects, such as healing and antibacterial on a common target, that is, it is a biomaterial of high biological compatibility, with aspects of reproducibility combined with biofunctionality costs, as these criteria constitute the greatest concern in the production process of the industrial sector, and especially in products aimed at health.

Keywords: Bacterial cellulose biomembrane; Antibacterial; Healing; Mastruz; EPP-AF®

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ANOVA: análise de variância

ATCC: *American Type Culture Collection*

B.O.D: Demanda Bioquímica de Oxigênio

BCM: Biomembranas de Celulose Bacteriana

CB: celulose bacteriana

DMEN: Meio Eagles Modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsufóxido

DRX: Difractometria de Raios-X

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetracético

EPP-AF®: Extrato Padronizado de Própolis *Apis mellifera*

ECHA: European Chemicals Agency

FT-IR: Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

HS: Hestrin e Schramm

MEC: matriz extracelular

MEC: Matriz Extracelular

MMPs: Metaloproteinases

MS: Ministério da Saúde

MTT: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]

NaOH 2%: Hidróxido de Sódio a 2%

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

pb: Pares de Bases

PBS: tampão fosfato salino

PEG 400: Polietileno glicol

400

pH: Potencial Hidrogeniônico

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde

RENAMA: Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais

SFB: Soro Fetal Bovino

SiBBr: Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira

TG: Termogravimetria

UFC: Unidade Formadora de Colônias

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Identificação dos grupos de biocurativos.....	46
Tabela 2: Caracterização macroscópica dos biocurativos.....	52
Tabela 3: Características organolépticas dos biocurativos, conforme a ANVISA.....	53
Tabela 4: Média e Desvio Padrão do teste antibacteriano em relação a medida do halo formado em mm ² das biomembranas em culturas de 24 horas frente as cepa padrão de <i>S.aureus</i> ATCC 25923.....	59
Tabela 5: Média e Desvio Padrão do teste antibacteriano em relação a medida do halo formado em mm ² das biomembranas em culturas de 24, 48 e 72 horas frente as cepas de <i>S.aureus</i> ATCC 25923 e <i>E.coli</i> ATCC 25922.....	61
Tabela 6: Ensaio de migração celular, considerando o tempo 0 e 24 horas de observação com dados gerados no Image J.....	64

LISTA DE FIGURAS

Pág.

FIGURA 1: Hierarquia taxonômica de <i>C. ambrosioides</i>	22
FIGURA 2: Partes aéreas de <i>C. ambrosioides</i> (Mastruz)	23
FIGURA 3: Abelha <i>Apis mellifera</i>	25
FIGURA 4: EPP-AF®	28
FIGURA 5: Membrana de celulose bacteriana aplicada como curativo na pele	32
FIGURA 6: Russell e Burch em 1959 - Princípios Humanitários da Experimentação Animal	37
FIGURA 7: Relação entre os requisitos de informação padrão (IRs) e possíveis alternativas ao teste em animais	37
FIGURA 8: Fluxograma dos procedimentos de produção e análises físico-químicas das membranas de celulose bacteriana	43
FIGURA 9: Processo de elaboração da biocelulose por <i>K. rhaeticus</i>	43
FIGURA 10: Processo de elaboração da biocelulose por <i>K. rhaeticus</i> etapa de incubação – cultura estática	44
FIGURA 11: Incorporação dos extratos nas biomembranas	46
FIGURA 12: Desenho experimental do teste antibacteriano	48
FIGURA 13: Desenho de placa do teste in vitro “ <i>Wound Healing</i> ” com células linhagem GM – Fibroblastos após a realização do risco (“ferida”), considerando a aplicação das biomembranas.	50
FIGURA 14: FIGURA 14: Biomembranas de celulose bacteriana (<i>K.rhaeticus</i>) prontas para a incorporação com os extratos	51
FIGURA 15: Biocurativos de celulose bacteriana incorporados com extrato de mastruz e APP-AF®	52
FIGURA 16: Caracterização dos biocurativos por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	54

FIGURA 17: Caracterização dos biocurativos por análise térmica por termogravimetria (TG)	55
FIGURA 18: Teste de viabilidade celular por MTT em linhagens de fibroblastos com extrato de mastruz e própolis, considerando o período de 24 horas.....	56
FIGURA 19: Teste antibacteriano – ausência e presença do halo de inibição utilizando BMC com extratos de mastruz, própolis e associações no tempo de 24 horas em <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	58
FIGURA 20: Teste antibacteriano – ausência e presença do halo de inibição utilizando BMC com extratos de mastruz, própolis e associações no tempo de 24 horas em <i>S.aureus</i> ATCC 25923 e <i>E.coli</i> ATCC 25923	60
FIGURA 21: Microscopia óptica em objetiva de 10X das células linhagem GM – Fibroblastos de pulmão Humano.....	63
FIGURA 22: Microscopia óptica das células linhagem GM – Fibroblastos de pulmão Humano com adesão à biomembrana de mastruz	63

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1 <i>Chenopodium ambrosioides</i> : Mastruz.....	22
2.2 Própolis de <i>Apis mellifera</i>	25
2.2.1 Extrato Padronizado de Própolis de <i>Apis mellifera</i> : o (EPP-AF®)	27
2.3 Biomateriais: uso de biomembranas em feridas e como antimicrobiano	29
2.4 Modelos <i>in vitro</i> de experimentação	35
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Coleta da matéria-prima e preparação dos extratos de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (Mastruz) e EPP-AF®	42
4.2 Produção e análises físico-químicas das biomembranas.....	42
4.3 Formulações dos extratos para incorporação nas biomembranas.....	45
4.4 Incorporação dos extratos nas biomembranas.....	45
4.5 Testes <i>in vitro</i>	47
4.5.1 Teste de citotoxicidade dos extratos de <i>C. ambrosioides</i> e EPP-AF®	47
4.5.2 Teste de atividade antibacteriana das biomembranas.....	48
4.5.3 Teste de atividade cicatrizante <i>in vitro</i>	49
4.6 Análise Estatística	50

5. RESULTADOS	51
5.1.1 Caracterização das biomembranas	51
5.1.2 Testes de citotoxicidade.....	55
5.1.3 Atividade antibacteriana das biomembranas.....	57
5.1.4 Atividade cicatrizante das biomembranas	62
6. DISCUSSÃO.....	65
7. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
APÊNDICE A: Relato de caso	86
APÊNDICE B: Pedido de Depósito de Patente no INPI	95
APÊNDICE C: Publicação de Patente no INPI	97
ANEXO A: Identificação botânica da espécie vegetal	98
ANEXO B: Tabela da caracterização química do mastruz	99
ANEXO C: HPLC/DAD: quantificação de substâncias bioativas do extrato de própolis (n=3 ± SD)	100
ANEXO D: Declaração de contemplação em edital para empreendimentos inovadores	101

1.INTRODUÇÃO

As feridas são responsáveis por relevantes índices de morbimortalidade e constituem um grave problema de saúde (OLIVEIRA et al, 2016; GALVÃO et al, 2017), pois quando não recebem tratamento adequado aumentam as chances de complicações para o paciente, causando sofrimento físico e emocional, que estão relacionados a inúmeros fatores, como por exemplo, a resposta biológica do indivíduo frente a reparação tecidual e os custos financeiros envolvidos (GALVÃO et al, 2017; BLAIR et al, 2020).

No segmento de reparação e regeneração tecidual, o uso de biomateriais para cicatrização de feridas tem recebido interesse crescente nos últimos anos (BARBOSA et al, 2016); (CORDEIRO et al, 2019; DINIZ et al, 2020). As pesquisas sobre novos produtos voltados à cicatrização de feridas são crescentes, especialmente, em relação ao uso de biomateriais (NAYAK et al., 2017). Os avanços da tecnologia abriram possibilidades de tratamento, no entanto, os desafios ainda são muitos, devido ao aumento da expectativa de vida da população, e o aumento de pessoas susceptíveis a desenvolver feridas de difícil cicatrização por conta da diabetes e obesidade (LIN et al. 2017).

Os biomateriais têm sido amplamente utilizados na fabricação de vários sistemas de liberação controlada de drogas (GUPTA et al, 2017; RAMASAMY et al, 2017; RAMASAMY et al, 2020). Para a administração na pele, o sistema de liberação do fármaco deve ser adesivo para maximizar o contato com a epiderme e oferecer uma liberação prolongada do fármaco durante um determinado intervalo na área da lesão (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2017; SOUTO et al, 2017). Os biopolímeros naturais como a, quitosana; o colágeno; o ácido hialurônico e a biocelulose, têm sido amplamente utilizados sozinhos ou em combinação com outros produtos, com vantagens comprovadas na otimização do processo de cicatrização de feridas (CHANTRE et al, 2019; PANG et al, 2020).

O mercado global de biomateriais está projetado para atingir 47,5 bilhões de dólares até 2025, e um dos setores que mais será impulsionado é o segmento de desenvolvimento de novos produtos para a cicatrização de feridas (MARKETANDMARKET,2022). Diante dessa perspectiva, tem sido crescente o

aumento do uso de medidas terapêuticas alternativas para regeneração e cicatrização de feridas, especialmente, por meio do uso de produtos naturais e biomateriais (KUZMANOV; KOSANAM; DIAMANDIS, 2013).

Sabe-se que, alguns produtos naturais possuem propriedades emolientes, adstringentes antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes capazes de melhorar o processo de cicatrização de feridas (MOGOŞANU; GRUMEZESCU, 2014).

Os produtos oriundos da biodiversidade, cada vez mais tem despertado o interesse mundial e o Brasil está em uma posição de destaque, uma vez que, possui uma vasta variedade de espécimes animais e vegetais espalhados nos ecossistemas e biomas brasileiros, sendo inclusive detentor de uma rica tradição no uso de plantas medicinais (GADELHA et al., 2015; FERREIRA et al., 2016).

Dentre os espécimes vegetais, *Chenopodium ambrosioides* L. (Syn. *Dysphania ambrosioides*), cujo um dos nomes vernaculares é mastruz, apresenta propriedades farmacológicas diversas, especialmente, em aplicações no campo da cicatrização (MARINS et al, 2011; (PENHA et al, 2017); (PINHEIRO NETO et al, 2017; (GODINHO, 2019).

Se tratando da biodiversidade animal temos as abelhas, que produzem uma resina de grande importância nas aplicações terapêuticas, a própolis. O Brasil com sua vasta extensão territorial possui diferentes tipos de própolis, sendo as propriedades e a composição química de cada tipo relacionada com as características fito-geográficas da região onde é coletada, a exemplo da fonte vegetal e das condições climáticas, (BANKOVA et, al, 1996; ZEGGIO et al., 2013).

As técnicas de incorporação de extratos vegetais e de própolis aos biopolímeros têm sido utilizadas com o propósito de potencializar o efeito regenerativo e antimicrobiano desses biomateriais, considerando a terapêutica de feridas. Pinheiro Neto et al, (2017) formularam uma composição farmacêutica, a partir de um biomaterial em gel incorporado com extrato de mastruz com o objetivo de utilizar como enxerto ósseo cicatrizante em coelhos com a tíbia fraturada. Barud et al (2013), por sua vez, fizeram um bioproduto composto por membrana de celulose bacteriana e própolis com efeito cicatrizante e antimicrobiano em de modelo experimental com *Rattus norvegicus* Holtzman.

O potencial destas biomembranas de celulose está voltado na capacidade de se comportar como uma barreira fisiológica, porosa, isolante quanto ao contato de microrganismos, a ação é antioxidante e regeneradora (BASMAJI, 2016). Essas características são responsáveis pelo diferencial curativo, quando comparado a curativos usuais.

Este produto é biodegradável, biocompatível, não tóxico, e não alergênico. A microporosidade reduz a perda de água, preserva a umidade adequada, permite a oxigenação de áreas danificadas e cria um ambiente ideal para granulação e epitelização. Com isso, forma uma barreira que impede contaminação bacteriana e redução da dor local porque a terminação nervosa é isolada, favorecendo a cicatrização e sua aplicação proporciona uma pele temporária para o tratamento de queimaduras e ferimentos de difícil cicatrização (BASMAJI et al, 2011; MUALLA et al, 2016),

A motivação deste trabalho foi norteadada pela problemática das feridas, e teve por objetivo obter um biocurativo como agente cicatrizante e antibacteriano composto por celulose bacteriana, extrato de mastruz e extrato de própolis com possíveis aplicações em feridas. Visamos assim, contribuir para o desenvolvimento de novas terapêuticas no âmbito da cicatrização de feridas.

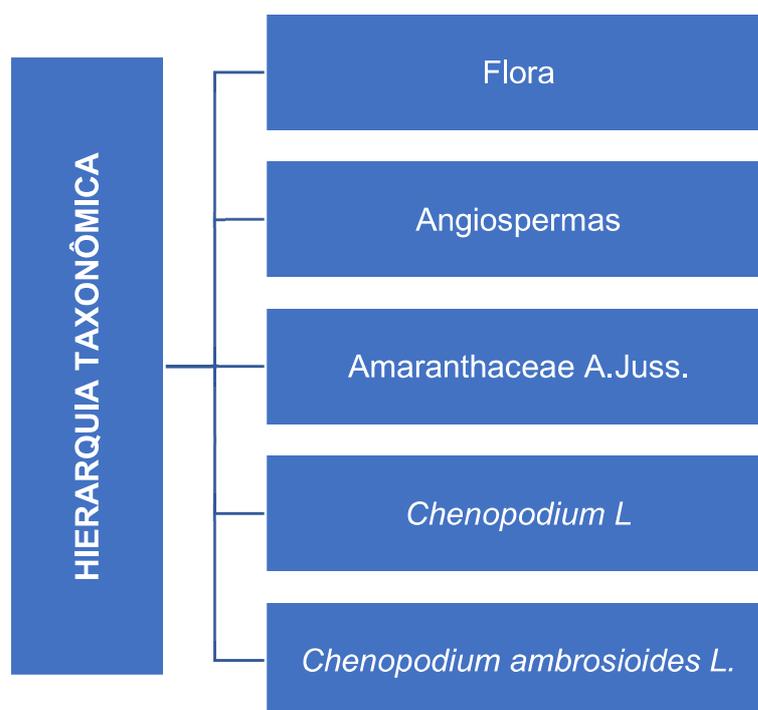
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Chenopodium ambrosioides*: Mastruz

Chenopodium ambrosioides é uma espécie vegetal muito utilizada e conhecida popularmente como mastruz, menstrução ou Erva de Santa Maria, nativa da América Central e do Sul, oriunda, provavelmente, do México. A espécie vegetal possui crescimento espontâneo em regiões de clima tropical, subtropical, especialmente, na América e África, e temperado. Ela pode também ser encontrada desde o Mediterrâneo até a Europa Central (KISMANN, 1991; SENNA, 2010). No Brasil, a distribuição geográfica da espécie *C. ambrosioides* é extensa e possui abrangência em todo o território nacional (SiBBr, 2022).

De acordo com a hierarquia taxonômica de *C. ambrosioides* no SiBBr, a espécie é uma angiosperma que pertence a família Amaranthaceae, (**Figura 1**).

FIGURA 1: Hierarquia taxonômica de *C. ambrosioides*



Fonte: SiBBr, 2022

Sendo assim, dentre suas características podemos dizer que se apresenta como uma erva perene ou anual, que atinge até 1 m de altura, em média, sendo bastante ramificada. As folhas são alongadas, alternas, pecioladas e possuem tamanhos diversos (**Figura 2**). As folhas menores ficam localizadas na parte superior da planta e as folhas maiores na parte inferior. As flores são pequenas, verdes, dispostas em espigas axilares densas. Produz numerosas sementes esféricas, pretas e ricas em óleo. Tem odor forte, desagradável e característico (COSTA et al, 2006).

FIGURA 2: Partes aéreas de *C. ambrosioides* (Mastruz)



Fonte: Rocha, 2021

O Ministério da Saúde (MS) em 2009 publicou uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), considerando o seu largo uso no Brasil, e os vários estudos acerca de suas propriedades terapêuticas. *C. ambrosioides* foi uma das 71 espécies escolhidas pelo MS, ocupando a 17^a posição da lista. O RENISUS foi criado pelo MS com a finalidade de orientar novos estudos e pesquisas que possibilitem na elaboração de fitoterápicos para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças (MS, 2022).

Essa espécie vegetal, em virtude das suas propriedades terapêuticas, é reportada em uma vasta literatura científica, onde são comprovadas suas diversas aplicações como alternativa de tratamentos, tanto na medicina humana, quanto na veterinária. Ela produz diversos metabólitos secundários responsáveis

por suas atividades farmacológicas, tais como compostos fenólicos, catequinas, esteróides, flavonóides, taninos, triterpenóides e óleo essencial, sendo considerados os princípios ativos responsáveis por suas propriedades terapêuticas (MARINS et al, 2011); (RODRIGUES et al, 2021).

Nos estudos relacionados a leishmanioses, especificamente, no tratamento de feridas e úlceras leishmanióticas podemos citar Pinheiro et al, (2008) que utilizaram o extrato hidroalcoólico como tratamento da leishmaniose e observaram o controle dos mecanismos regulatórios da disseminação de *Leishmania amazonenses*, mas também o efeito leishmanicida. Reis et al, (2012) avaliaram o potencial leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* com quatro frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides*. Da mesma forma, Godinho (2019) mostrou a eficácia no tratamento de úlceras leishmanióticas pelo do uso tópico com a pomada de *C. ambrosioides*.

Nessa linha ainda de pesquisas associadas ao efeito cicatrizante destacam-se também os trabalhos de Nascimento (2013) que formulou uma pomada com o extrato hidroalcoólico de folhas de *C. ambrosioides* para o tratamento de feridas e de Pinheiro Neto et al, (2017) que obtiveram um biomaterial de *C. ambrosioides* destinado na aplicação de fratura óssea em coelhos apresentando ser biocompatível por induzir neoformação óssea mais precoce.

Considerando a atividade imunomoduladora do extrato de *C. ambrosioides*, Nascimento et al, (2006) demonstraram efeito inibidor do crescimento tumoral em dois sistemas experimentais, por Inibição do tumor ascítico e sólido de *Ehrlich*. Essa inibição foi observada com base no tratamento com o extrato de *C. ambrosioides* administrado 48 horas antes ou após a implantação do tumor de Ehrlich na pata ou cavidade peritoneal de camundongos, onde reduziu o crescimento tumoral através da ativação de macrófagos, células estas que são cruciais em inibir o crescimento de neoplasias e microrganismos, principalmente, por meio da produção de metabólitos do oxigênio (H₂O₂), nitrogênio (NO) e citocinas (NASCIMENTO et al,1998); (NASCIMENTO et al, 2002).

Cruz et al, (2007) observaram que uma baixa dose do extrato das folhas de *C. ambrosioides* induziu a ativação de macrófagos e aumentou o recrutamento e a proliferação celular em órgãos linfoides secundários. Calado et al (2015) demonstraram que o tratamento oral com extrato de *C. ambrosioides*, além do efeito imunomodulador induziu efeitos anti-inflamatório (anti-artrite) e o antinociceptivo, com inibição da inflamação sinovial, modulação da proliferação de linfócitos acompanhada da diminuição da dor. Finalmente, Rios et al, (2017) demonstraram que o tratamento profilático com *C. ambrosioides* reduziu a inflamação sistêmica associada à sepse. Tal fato, foi relacionado a um efeito modulador na resposta imune com ativação de fagócitos no local da infecção.

Vale ressaltar os estudos de Cysne et al, (2016) que relataram a capacidade antimalárica do extrato de *C. ambrosioides* e de Rodrigues et al, (2019) demonstraram a atividade anti-esquistossomótica do extrato e a sua capacidade em modular a resposta imune a favor do hospedeiro vertebrado, regulando o processo inflamatório granulomatoso ocasionado pela esquistossomose.

2.2 Própolis de *Apis mellifera*

A própolis é um produto das abelhas com ferrão e sem ferrão, as abelhas africanizadas da espécie *Apis mellifera* são as mais comuns no Brasil (**Figura 3**).

FIGURA 3: Abelha *Apis mellifera*



Fonte: Google imagens, 2022

Esse produto natural das abelhas é formado por uma mistura complexa de compostos químicos coletados em plantas e associados às secreções

salivares, cera e pólen (CASTALDO et al, 2002). O uso medicinal da própolis é relatado desde o antigo Egito, onde os povos egípcios realizavam o embalsamento dos corpos e o tratamento de feridas, na atualidade, tem sido destacada com base em preparações farmacêuticas variadas, como por exemplo, pomadas, géis, cremes e dentre outras, desta forma contribuindo com a economia e melhoria da qualidade de vida (CASTALDO et al, 2002); (PARK, 2002).

O interesse da comunidade científica por essa matéria-prima, tem relação com suas inúmeras propriedades biológicas, como por exemplo, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, imunomoduladora, antitumoral (SFORCIN et al, 2017). De acordo com Ferreira et al, (1996) a própolis é composta por 50% a 60% de resinas vegetais; 30% a 40% de cera; 8 a 10% de óleos essenciais; e 5% de pólen aproximadamente, o que reflete na sua composição química a presença de compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos) minerais e vitaminas, por exemplo.

A composição química da própolis tem relação com o tipo de florada e com a técnica de extração empregada. Nesse sentido, a flora da região e a época da colheita são fundamentais para compor seus constituintes químicos, além do grau de "africanização" da espécie da abelha. Somente no caso do Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país, essa variação ocorre em virtude da grande biodiversidade brasileira (PEREIRA et. al, 2002).

A coloração da própolis é dependente de sua procedência, podendo variar de um marrom escuro até ao marrom avermelhado. Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra, apesar de algumas amostras de própolis não possuir nenhum odor. O ponto de fusão é variável entre 60-70°C, podendo atingir em alguns casos, até 100°C. Em 15°C a própolis é uma substância dura, tornando-se maleável a partir de 30°C (**Figura 4**). Alguns solventes, tais como: éter, etanol, acetona, tolueno e tricloroetileno, permitem a dissolução de muitos constituintes da própolis (LIBERATO, 2016).

Segundo Zeggio (2016), conhecer as fontes botânicas contribui para a identificação das características típicas da própolis de determinada origem geográfica, como sua composição química e atividades biológicas esperadas, servindo de parâmetro para padronização química da própolis. Em sua pesquisa

apresenta dois exemplos de sucesso de caracterização da própolis brasileira, baseado em extensas investigações científicas e conhecimento da fonte botânica: a própolis vermelha e a verde

De acordo com Sforcin (2017), a própolis “vermelha” é originada de uma vegetação encontrada sobretudo nos manguezais dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, a chamada *Dalbergia ecastophyllum* e popularmente denominada por “marmeleiro da praia”. Enquanto que, a própolis “verde”, muito encontrada em São Paulo e Minas Gerais, sendo considerada a mais conhecida no Brasil, tem sua principal fonte vegetal *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo). Portanto, trata-se da própolis brasileira com maior procura pelo mercado internacional para produção de medicamentos.

A própolis é usada pelas abelhas para fechar pequenas frestas existentes nas colmeias com o objetivo, principalmente, de proteger a colônia contra a invasão de outros insetos, com isso, é possível regular a temperatura interna e isolar compartimentos não utilizados. Além disso, também é usada pelas abelhas como higienizador dos favos e paredes internas do ninho e para envolver pequenos animais mortos ou partes deles que sejam muito grandes para as abelhas levarem para fora da colmeia. As propriedades antibacterianas e antifúngicas da própolis protegem a colônia de doenças, reduz os riscos de infecção das larvas e de crescimento bacteriano em tecidos em decomposição de animais mortos (KRELL, 1996).

Nesse sentido, muitos são os trabalhos científicos que evidenciam o campo de aplicação da própolis e o desenvolvimento de pesquisas nas últimas décadas tem comprovado que a própolis brasileira possui propriedades terapêuticas com mais de 300 componentes diferentes identificados, que apresentam atividades biológicas como por exemplo, antimicrobianas, antiinflamatórias, antifúngicas, cicatrizante, antioxidante e até mesmo antivirótica (FISCHER et al, 2010; NUNES, 2019).

2.2.1 Extrato Padronizado de Própolis de *Apis mellifera*: o (EPP-AF®)

Vários são os tipos de própolis produzidas pelo Brasil, Berretta et al, (2012) padronizaram um extrato de própolis de *Apis mellifera* e sua composição química e propriedades biológicas foram determinadas juntamente com sua

reprodutibilidade lote a lote, o que propiciou o desenvolvimento de um produto denominado Extrato Padronizado de Própolis de *Apis mellifera*. O EPP-AF® (**Figura 4**) é produzido pela empresa Apis Flora LTDA e sua composição química e propriedades biológicas foram determinadas juntamente com sua reprodutibilidade lote a lote (BERRETTA et al, 2012).

O nosso grupo foi um dos primeiros a demonstrar que o EPP-AF® apresenta ação anti-inflamatória local e sistêmica resultante de uma ação imunomoduladora (MACHADO et al, 2012). Marquiafável et al,(2015) formularam um sistema de encapsulamento e as condições de spray-drying para a obtenção de um extrato de EPP-AF® com alto teor de flavonóides e com a atividade antibacteriana. Braga (2017), por sua vez, mostrou que o EPP-AF® tem efeito anti-inflamatório sistêmico em candidemia, enquanto que, Assis et al, 2022 demonstraram efeito antibiofilme do EPP-AF® em ação contra os microrganismos *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella intermédia*, dos quais são frequentemente associados como agentes etiológicos de infecções endodônticas, periodontais e da cavidade oral.

Também foi observado efeito imunomodulador do EPP-AF® por Silveira et al, (2022) quando pacientes com Doença Renal Crônica em hemodiálise convencional, apresentaram aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias, especialmente, naqueles com glomerulopatias primárias. Parro et al, (2022) mostraram que o EPP-AF® pode auxiliar no controle da estomatite. Em relação à cicatrização de feridas também houve resultados significativos (BARUD et al, 2013; OLIVEIRA et al, 2019).

FIGURA 4: EPP-AF®



Fonte: Rocha, 2021

2.3 Biomateriais: uso de biomembranas em feridas e como antimicrobiano

O uso dos biomateriais para o fechamento de feridas não é recente, por volta de 4000 anos, no Egito antigo, os egípcios faziam uso de fios de linho e na Idade Média na Europa, eram realizadas suturas confeccionadas com intestino de gato (PATEL; GOHIL, 2012).

A comunidade médica no final do século XIX e início do século XX, começou a investigar o modo de reação dos biomateriais implantados no corpo através da observação em animais, e a partir disso, percebeu-se que o organismo não tolerava a entrada desses materiais sem causar reações. Mas após a Segunda Guerra Mundial, essa visão foi alterada, pois foi possível realizar estudos e observações com ex-combatentes feridos (RATNER, 2013).

A evolução quanto as aplicações médicas dos biomateriais percorreram três gerações. A primeira geração considerava os biomateriais com propriedades específicas para a sua utilização clínica, eram vistos como bioinertes, ou seja, o interesse era apenas a obtenção de materiais com compatibilidade biológica capaz de substituir um tecido danificado e fornecer suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente; a segunda geração procurou aumentar o tempo de vida do implante, levando em consideração a interação com o hospedeiro, através de materiais bioativos capazes de desencadear uma reação controlada nos tecidos; terceira geração tem sido explorado o conceito de biomimética, ou seja, busca-se os materiais que participam ativamente do aspecto biológico através da regeneração tecidual com estimulação em nível celular (RATNER et al, 2013).

Os biomateriais são compostos por polímeros, estes incluem macromoléculas formadas por unidades de repetição da cadeia polimérica, ou seja, os meros que originam extensas cadeias a partir de reações de polimerização e são interligados através de ligações covalentes, também podem ser chamados de biomateriais poliméricos ou biopolímeros, porém, formados por macromoléculas orgânicas (BENATTI, 2017).

Nesse contexto, os biomateriais podem ser classificados de acordo com a sua origem podendo ser naturais ou sintéticos, dentre os biomateriais naturais podemos citar como exemplo, o colágeno, a quitosana, e a celulose bacterina (HELMUS et al, 2008); (PIRES et al, 2015).

Existem cinco propriedades em um biomaterial elencadas com o objetivo de apresentar as condições ideais, no qual deve ser levada em consideração no processo de desenvolvimento: Biocompatibilidade (1); Biofuncionalidade (2); Propriedades mecânicas (3); Resistência à corrosão (4); Ser esterilizável (5). (1) A biocompatibilidade refere-se na propriedade de um material ser biologicamente compatível, conseqüentemente, não produzir uma resposta tóxica ou imunológica nos tecidos. (2) A biofuncionalidade está associada a descrição do comportamento do material implantado no organismo, onde tem íntima relação com as características do próprio biomaterial; (3) As propriedades mecânicas que incluem o limite de elasticidade, ductilidade, tenacidade à fratura e as resistências mecânicas, como a tração, a compressão, a flexão, fadiga, a torção, e ao cisalhamento; (4) A resistência a corrosão, pois como há o contato entre o biomaterial com o ambiente fisiológico é essencial que seja resistente ao meio em que se encontra, do contrário os produtos de degradação poderão causar uma reação ou até mesmo desencadear um processo patológico; (5) Ser esterilizável, importante que ocorra a destruição completa de todas as formas de vida microbiana, seja por meio de temperatura, produtos químicos, radiação e/ou plasma (LIMA, 2006).

Os biomateriais de origem natural são advindos de fontes renováveis como plantas, animais, bactérias e algas (GOMES et al, 2013). Estes biomateriais possuem grande aceitação por apresentarem propriedades semelhantes à dos tecidos biológicos, composições variadas, baixa toxicidade e indução de sinais biológicos para o crescimento celular (SEWELL-LOFTIN et al, 2011).

As biomembranas são formadas por diferentes tipos de biomateriais. Podem ser constituídas por polímeros naturais, como o látex de borracha natural, alginato, pectina, quitosana e celulose. O grande interesse em relação ao uso dessas membranas biológicas está relacionado à facilidade de acesso, obtenção de maneira sustentável e geração de produtos com maior biocompatibilidade (KHAN et al, 2015; GRIFFITI et al, 2000). Assim, as biomembranas, tem sido usadas em várias aplicações médicas, como no tratamento de úlceras crônicas, das feridas na pele, como sistema de liberação lenta e sustentada, na regeneração óssea, para restabelecer a angiogênese e ainda, como agentes

anti-inflamatórios, antimicrobianos e antifúngicos (FRADE et al, 2004; WHITE et al, 2014).

A celulose é a macromolécula orgânica mais abundante na natureza e está entre os principais componentes da parede celular das plantas e de algumas bactérias. A celulose bacteriana ou biocelulose é produzida extracelularmente por certos microrganismos, a partir da fermentação oxidativa, é um polissacarídeo linear não ramificado que consiste em β -1,4-glucopirano-se-unidades (KAJWADE et al, 2015).

Bactérias dos gêneros, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Zooglea* e *Sarcina ventriculi* (WHITE et al, 2014), bem como, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* são capazes de produzir celulose, sob certas condições, (ABBADE et al, 2004). No entanto, *Komagataeibacter rhaeticus*, também conhecida como *Acetobacter xylinum*, e *Gluconacetobacter xylinus*, são os microrganismos de escolha na produção da biocelulose para fins comerciais, devido ao elevado rendimento que apresentam. Adicionalmente, esse tipo de celulose possui boa capacidade de assimilar diferentes açúcares (ZOGAJ et al, 2001).

A celulose bacteriana é produzida por microrganismos cultivados em meio de cultura rico em carboidratos e quando comparada à celulose vegetal, apresenta inúmeras vantagens, como por exemplo, fisicamente mais resistente e com grau de pureza maior por ser livre de lignina e da hemicelulose, pode ser moldada durante o cultivo em estruturas tridimensionais, além de apresentar alta porosidade, capacidade de absorção, nível aumentado de cristalinidade e biocompatibilidade. Essas características fazem do material um insumo interessante para aplicação nas áreas de medicina, farmácia, cosmética, nas indústrias alimentícia, têxtil e de eletrônicos (ZOGAJ et al, 2001; ABOL-FOTOUH et al, 2020).

A celulose bacteriana (CB) é obtida pela biosíntese da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* em um meio de cultura que contenha fontes de carbono e nitrogênio. Esta bactéria é considerada atualmente como a única espécie capaz de produzir celulose em escala industrial. A CB possui fórmula molecular idêntica a celulose das plantas (CP), no entanto é obtida pura quimicamente (livre de lignina, hemicelulose e pectina). Além disto, apresenta uma estrutura de nanofios de celulose (“nanoceluloses”) que geram um sistema

3-D com excelentes propriedades mecânicas. As diferentes possibilidades de modificação química e processamento assim como todos aspectos positivos ligados a sua produção (auto-sustentável) e utilização (material biocompatível e biodegradável) (BARUD, 2012).

As biomembranas de celulose bacteriana (BCM) são biodegradáveis, atóxicas, não alergênicas, e, conseqüentemente, biocompatíveis (**Figura 5**). A suas microporosidades reduzem a perda de água, preservando a umidade adequada, permitindo a oxigenação das áreas danificadas e criando um ambiente ideal para granulação e epitelização. As BCM formam uma barreira que impede contaminação bacteriana ao mesmo tempo que reduzem a dor local, porque as terminações nervosas na área da lesão são isoladas, favorecendo a cicatrização (MUALLA et al, 2016). Tais propriedades são responsáveis pelo diferencial de um curativo e sua aplicação funciona como uma pele temporária para o tratamento de queimaduras e ferimentos de difícil cicatrização (BASMAJI et al, 2011).

FIGURA 5: Membrana de celulose bacteriana aplicada como curativo na pele



Fonte: Google imagens, 2022

O potencial da celulose bacteriana na produção de biomembranas deve-se a capacidade que esse produto apresenta de se comportar como barreira fisiológica, porosa, mas ao mesmo tempo isolante, com ação antioxidante e regeneradora, além de proteger de infecções (BASMAJI, 2016). Apresentam ainda inúmeras características que a diferem da celulose vegetal, tais como alta cristalinidade e força de tensão, elasticidade, durabilidade, elevada capacidade de absorção e retenção de água. Além disso, a celulose é um polímero biodegradável e biocompatível, não tóxico e não alergênico (BARUD, 2012).

As feridas constituem um sério problema de saúde pública e, trazem impacto ao indivíduo e à sociedade devido à interferência nos aspectos biopsicossociais de seu portador e aos elevados custos aos serviços de saúde causados pelo tratamento. Um dos fatores relacionados à complexidade das feridas é a infecção microbiana, tratamento antimicrobiano e, não obstante, a resistência bacteriana (SANTOS, et al, 2018).

A resistência bacteriana aos antibióticos ocorre em todo o mundo, em níveis extremamente elevados que sem ação urgente, existe a possibilidade de uma era futura as infecções comuns e pequenas lesões serão considerados mortais (WHO, 2021).

Lesões infectadas, principalmente, as feridas crônicas desafiam, constantemente, os profissionais e a Rede Pública de Saúde no intuito de identificar os microrganismos e desenvolver um plano para conter ou prevenir possíveis infecções e complicações, como as amputações. Essas lesões contêm algumas bactérias que são capazes de dificultar o processo de cicatrização, onde a classe das Gram-positivas é representada em maior ocorrência pela *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp*, as Gram-negativas pelos bacilos da família *Enterobacteriaceae*, por exemplo, a *Escherichia coli* (BARUD et al, 2013; ROCHA et al, 2022).

Além de ser um desafio, o tratamento dos diferentes tipos de feridas, os custos gerados são frequentemente elevados para os sistemas de saúde. No Brasil, o custo médio do internamento de pacientes queimados foi em torno de R\$68 milhões/ano (SAAVEDRA et al, 2019). Nos EUA, o custo total para a gestão da úlcera diabética nos EUA foi em torno de 4 bilhões de dólares (RAGHAV et al, 2018).

A diabetes está associada ao aumento das taxas de hospitalizações e, conseqüentemente, em uma maior utilização dos serviços de saúde. Em seguida, a incidência de doenças cardiovasculares e as amputações não traumáticas de membros inferiores, constituem uma carga representativa nos próximos anos para os sistemas de saúde de todos os países, independentemente do seu desenvolvimento econômico, porém, obviamente que a carga será maior nos países em desenvolvimento, uma vez que a maioria enfrenta desafios diários no controle de doenças infecciosas, gerando um caos aos sistema de saúde (Sociedade Brasileira de diabetes/ Diretrizes 2019-2020).

Nesse cenário, a busca por novas terapêuticas vem sendo cada vez mais urgentes. O uso de biomembranas bioativas aplicadas em lesões cutâneas tem sido incentivado, pois estimulam e melhoram a reparação tecidual o que proporciona qualidade e conforto para os pacientes (CAMPELO et al, 2021).

Dentre as substâncias naturais que são utilizadas em conjunto as membranas, faz-se o destaque para a própolis e o mastruz que ambos possuem literatura científica de grande relevância, especialmente, como agente antimicrobiano e cicatrizante (BERRETA et al, 2012; BARUD et al, 2013; SILVA et al 2017; MARTINOTTI et al, 2019; GONZÁLEZ-MASÍS et al, 2020; OLCZYK et al, 2020; NASCIMENTO, 2013; MEDEIROS, 2016; RIOS et al, 2017; PINHEIRO NETO et al, 2017; GODINHO, 2019, REGIS et al, 2020; RODRIGUES et al, 2021).

O mercado global dos curativos para a pele foi de aproximadamente de 20,4 bilhões de dólares em 2021, representando um segmento crucial da indústria de tratamento de feridas (HOMAEIGOAR; BACCACCINI, 2020). Para que os biomateriais possam ser aplicados na área médica é necessário o cumprimento de alguns requisitos, tais como: baixa toxicidade; facilidade de processamento; tempo de vida útil adequado para o local de aplicação; biocompatibilidade; no caso dos biomateriais biodegradáveis, os subprodutos de sua degradação não devem ser tóxicos; eficácia e possibilidade de esterilização; não devem ser carcinogênicos (JAHNO, 2005); (KUCHARCZYK, 2013); (CHEN, LIANG; THOUAS, 2013).

As propriedades físico-químicas dos biomateriais são fundamentais para as respostas frente aos processos de adesão, proliferação e diferenciação celular (HUTMACHER et al, 2007). Nesse sentido, as técnicas de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e a análise térmica por Termogravimetria (TG), tem sido amplamente utilizadas para esse tipo de caracterização (BARUD et al, 2016).

A FTIR é uma técnica de espectroscopia vibracional que tem sido usada há mais de dez anos na identificação de substâncias desconhecidas. O teste fornece informações sobre os modos de vibração molecular, que por sua vez dependem da estrutura da molécula. As vibrações moleculares envolvem energias que correspondem a energias de fótons infravermelhos. Na espectroscopia molecular, tais fótons podem ser absorvidos pela molécula que

está sendo objeto de estudo, excitando modos de vibração da molécula, resultando, dessa interação entre fótons e molécula, espectros de absorção na região do infravermelho. Assim, pode-se investigar a geometria e as forças de interação entre os átomos que constituem a molécula, pois seus espectros dependem desses fatores (ADT et al, 2006).

É importante mencionar que a radiação infravermelho não possui energia suficiente para provocar transições eletrônicas, por esse motivo, apresenta como fundamento a teoria corpuscular, a radiação eletromagnética que provoca as vibrações é quantizada, envolvendo fótons de energia específica, ou seja, pacotes de energia. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), entretanto, a sua absorção ocorre em frequências específicas para cada grupo funcional, devido ao arranjo característico de átomos e ligações presentes na molécula (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2013). As absorções de grupos funcionais químicos variam em uma larga faixa porque as bandas provêm de interações complexas com moléculas, as bandas de absorção correspondem majoritariamente a um único modo vibracional. Além disso, algumas bandas de absorção permanecem razoavelmente fixas no espectro como, por exemplo, as provenientes dos modos de deformação axial de C-H, O-H e C=O, independentemente de possíveis interações. A posição exata da banda de absorção e as mudanças nos contornos das bandas revelam detalhes importantes da estrutura da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

A Termogravimetria (TG) como técnica de análise térmica, em que a amostra é colocada em uma termobalança e verifica-se a variação da massa de uma amostra em função da temperatura em relação ao tempo IONASHIRO (2004). Esse tipo de análise é uma técnica analítica na qual é capaz de avaliar as propriedades térmicas e estrutura dos materiais (FARIA et al, 2002).

Destarte, uma terapêutica adotada de forma adequada, através de membranas bioativas, pode contribuir para uma qualidade de vida mais digna aos pacientes e uma redução significativa aos diversos serviços de saúde (CAMPELO et al, 2021).

2.4 Modelos *in vitro* de experimentação

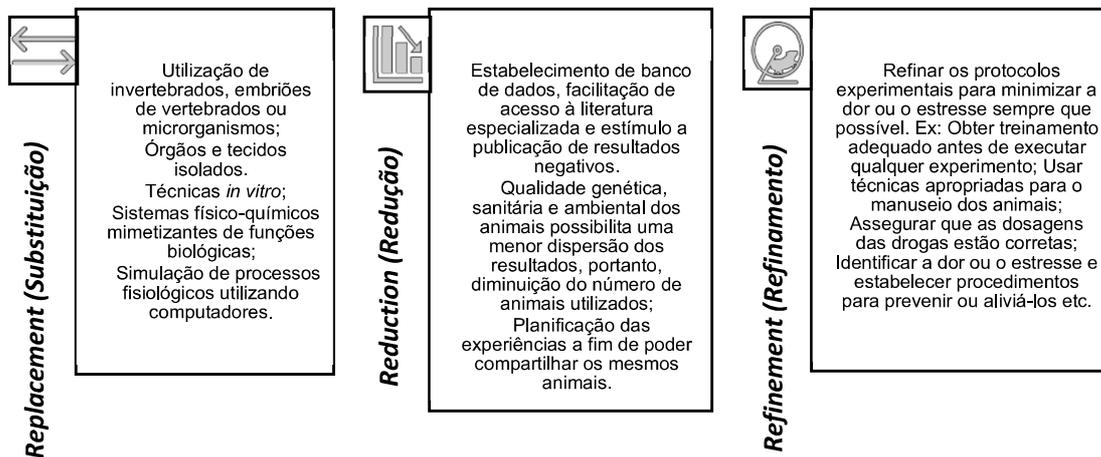
Historicamente os animais foram alvos de estudos relacionados a saúde, há registros desse modelo de experimento na Grécia Antiga, com o grego Alcmaeon (500 a.C.), Aristóteles (384- -322 a.C.), o francês René Descartes (1596-1650), Louis Pasteur (1822-1895), entre outros. A dualidade entre questões éticas e o uso de animais, sempre esteve em discussão, até mesmo na Grécia Antiga através de Pitágoras (570- -495 a.C.), primeiro defensor dos animais que se tem registro. Por outro lado, os avanços que os testes proporcionavam também eram indiscutíveis, ajudando a salvar milhares de pessoas a cada nova descoberta (ANDRADE, 2021).

O modelo animal atualmente é aplicado em diversas categorias de pesquisa científica, onde assume uma ampla importância no aperfeiçoamento e compreensão acerca do mecanismo fisiopatológico das doenças, ensaios terapêuticos de novos fármacos e estudos de marcadores biológicos. Apesar dos benefícios proporcionados a partir dos resultados dessas experimentações, as discussões sobre a utilização ou não dos animais na pesquisa científica tem aumentado cada vez mais e por esse motivo, os pesquisadores Russel e Burch em 1959 instituíram o princípio dos 3Rs- Replacement (Substituição), Reduction (Redução) e Refinement (Refinamento) intitulados de Princípios Humanitários da Experimentação Animal. Desde então, tais princípios impulsionaram as pesquisas no meio científico para modelos alternativos, como por exemplo, os métodos alternativos *in vitro*, que se baseiam no cultivo em laboratório de tecidos, órgãos ou células, ou seja, fora do organismo animal (AMON et al, 2021).

A substituição (*Replacement*), sugere aos pesquisadores sempre que possível estudos em animais vertebrados vivos, por invertebrados, embriões de vertebrados ou microrganismos; órgão, tecidos e células isolados de animais ou humanos; técnicas *in vitro*; utilização de sistemas físico-químicos mimetizantes de funções biológicas; simuladores de sistemas fisiológicos através de computadores. A redução (*Reduction*), indica aos pesquisadores o uso de banco de dados, qualidade sanitária aos animais, de modo a reduzir a dispersão nos resultados e, conseqüentemente, a redução de animais utilizados; planejar as experiências, de modo a compartilhar os mesmos animais. O refinamento (*Refinement*), sugere a constante reavaliação de protocolos experimentais com

objetivo de aliviar ou prevenir a dor e o estresse sempre que for possível (**Figura 6**).

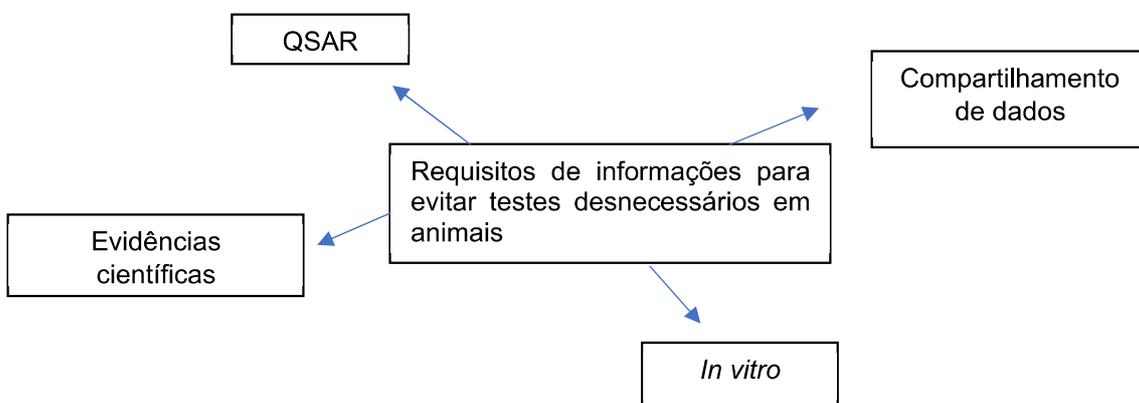
FIGURA 6: Russell e Burch em 1959 - Princípios Humanitários da Experimentação Animal



Fonte: Rocha, 2022. Com base em <https://ceua.ufes.br/principio-dos-3-rs>

O Regulamento Agência Europeia de Produtos Químicos (REACH) exige que sejam geradas novas informações sobre propriedades perigosas, evitando, sempre que possível, testes desnecessários em animais. Para isso, relacionou os chamados requisitos de informação padrão que correspondem nos métodos alternativos para o uso aos testes em animais (**Figura 7**).

FIGURA 7: Relação entre os requisitos de informação padrão (IRs) e possíveis alternativas ao teste em animais



Fonte: Adaptado, ECHA, 2016

Os métodos alternativos, *in vitro*, estão sendo continuamente desenvolvidos e, conseqüentemente, os requisitos de informação padrão do REACH estão sendo adaptados. Um teste *in vitro* (latim: em vidro) é realizado em um ambiente laboratorial controlado, com a utilização de um tubo de ensaio ou placas específicas para o cultivo de células um organismo vivo, por exemplo. Em contraste, um teste realizado *in vivo* (latim: no vivo) é aquele que usa um organismo vivo, no caso, um animal vertebrado. Os resultados obtidos a partir de métodos *in vitro* adequados podem indicar a presença de determinada propriedade ou podem ser importantes para a compreensão do modo de ação da substância (ECHA, 2016).

Neste contexto, "adequado" significa suficientemente bem desenvolvido de acordo com os critérios de desenvolvimento de teste acordados internacionalmente (por exemplo, os critérios de pré-validação do Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM)). A validação é o processo pelo qual a confiabilidade e a relevância de um procedimento são estabelecidas para um propósito específico. Através da promoção de métodos alternativos, vários métodos de teste *in vitro* passaram por validação internacional e foram aceitos para uso regulatório. Sendo assim, quando um teste *in vitro* é usado como uma adaptação referente a um determinado teste *in vivo* considerado padrão, e se mesmo os resultados desse teste *in vitro* indicarem a ausência de uma propriedade intrínseca, o teste padrão ainda pode precisar ser realizado para confirmar a ausência da propriedade. As exceções incluem os testes *in vitro* para os quais podem ser aceitos resultados negativos, quando usados como parte de uma abordagem integrada. Por exemplo, quando os testes *in vitro* já são aceitos como requisitos de informação padrão (por exemplo, para parâmetros de corrosão/irritação da pele e lesões oculares graves/irritação ocular) ou são etapas essenciais em uma estratégia de teste integrada padrão (por exemplo, no caso de mutagenicidade) (ECHA, 2016).

No Brasil tem a Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (RENAMA) criada desde 2012 que foi uma resposta do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI) aos anseios da sociedade, da academia e da indústria no sentido de diminuir e substituir o uso de animais em pesquisas e no setor industrial. A RENAMA considera tendência mundial que o uso de

animais seja diminuído ou substituído por métodos alternativos (RENAMA, 2021).

Muitas são as questões que envolve os testes realizados em animais, por exemplo, na Europa esses testes para fins cosméticos já são proibidos. Apesar de alguns outros locais ainda utilizar desse recurso, por outro lado, existem diversas reivindicações da população para encerrar essas ações e vários clientes não compram mais produtos de marcas que realizam esses experimentos, pois esse público é preocupado com um uso consciente dos produtos, empresas como a Natura e a Boticário não realizam mais testes em animais e sim fazem uso de tecnologias *in vitro* para o desenvolvimento dos seus produtos (TALKSCIENCE, 2021; BARROTE; VASCONCELOS, 2021).

Por esse motivo, pesquisas por novas abordagens terapêuticas vêm ganhando força, pois são essenciais aos tratamentos da problemática de feridas, que apresentam cicatrização tardia, sendo elas caracterizadas como agudas ou crônicas, uma vez que estão comumente associadas a doenças como isquemia, estase venosa, úlceras por pressão e diabetes mellitus (MENGONI et al, 2017).

Para os estudos de cicatrização de feridas, o ensaio "*in vitro*" tem sido utilizado e fundamenta-se na observação de uma cultura de células, um "risco" é feito (chamado *scratch*) em uma monocamada de células confluentes, as células na borda próxima ao "risco" irão proliferar e se mover em direção à abertura fechando progressivamente até que a monocamada celular seja retomada. Esta técnica "*in vitro*" imita em certa medida a migração e proliferação de células "*in vivo*" e tornou-se uma ferramenta fácil e bem desenvolvida para estudar o comportamento de diferentes linhagens celulares, como por exemplo a partir de fibroblastos (POLIOT et al, 2000; LIANG et al, 2007).

Os queratinócitos e os fibroblastos representam os principais constituintes celulares da pele (epiderme e derme). Na epiderme os queratinócitos correspondem cerca de 80%, onde são responsáveis pela formação do epitélio estratificado pavimentoso e produtores da queratina, que confere o papel de proteção. Em contrapartida, na derme estão os fibroblastos, células com aspectos morfológicos estrelado com prolongamentos citoplasmáticos e desempenham como principal função a síntese de colágeno, elastina, ácido hialurônico, também sintetiza fatores de crescimento para a diferenciação e proliferação celular, sendo uma célula chave no processo cicatricial da pele

(CLARK et al, 2007). Além disso, está envolvido com a produção de laminina e na influência dos queratinócitos na formação da membrana basal (GOLUBTSOVA et al, 2016).

Os fibroblastos são células mesenquimais diversas que participam da homeostase tecidual e produz matriz extracelular (MEC), criando nichos de sinalização por meio de sinais biofísicos e bioquímicos, pois criam e mantêm a um conjunto de tecidos conjuntivos ricos MEC para suportar funções essenciais dos órgãos, como por exemplo, resistência as lesões contundentes e cortantes, além disso, são capazes de realizar a secreção regulada de mediadores tais como, citocinas, fatores de crescimento e metabólitos (PLIKUS et al, 2021).

Por conta da sua versatilidade, essas células são amplamente selecionadas nos ensaios *in vitro* (HETTLER et al, 2013; URCIUOLO et al, 2022)

Nesse contexto, muito tem sido investigado acerca do uso de produtos naturais que são destinados ao tratamento de feridas e voltados para potencializar a cicatrização. Tal situação é ultimamente mais impulsionada por causa do aumento mundial de pacientes diagnosticados com feridas crônicas, sendo então cruciais o desenvolvimento de novas terapêuticas (GWAK; SOHN, 2017; CORREA et al, 2017).

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- ✓ Analisar a ação cicatrizante de biomembranas incorporadas com o extrato de *Chenopodium ambrosioides* associado EPP-AF®

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar as biomembranas de mastruz, EPP-AF® e mastruz associado ao EPP-AF®
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do extrato de mastruz associado ou não ao EPP-AF®;
- ✓ Investigar o efeito antibacteriano das biomembranas de mastruz, EPP-AF® e mastruz associado a própolis EPP-AF®;
- ✓ Avaliar o efeito cicatrizante *in vitro* da biomembrana incorporada com o extrato de mastruz associado ou não ao EPP-AF®;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta da matéria-prima e preparação dos extratos de *Chenopodium ambrosioides* (Mastruz) e EPP-AF®

As partes aéreas de *C. ambrosioides* foram coletadas no Bairro Alto do Farol, no município de Raposa, Maranhão, Brasil (2°27'34,6"S, 44°08'47,5" W). A espécie vegetal foi identificada pelo Dr. Eduardo Almeida, curador do Herbário do Maranhão da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde está depositada a exsicata (n° 9349).

Para a preparação do extrato, primeiramente, as folhas foram limpas, secas e trituradas, obtendo-se 250 g de matéria-prima. Este material foi submetido a um exaustivo processo de percolação em solução hidroalcoólica 70% e misturado a cada 8h, por 24h, para obtenção do hidromódulo 1: 5 (p / p). Posteriormente, o extrato hidroalcoólico bruto foi filtrado quatro vezes, concentrado sob pressão reduzida e liofilizado para obter o extrato seco (NEIVA et al, 2014). O processo de liofilização é necessário, pois minimiza a contaminação ou degradação do material, garantindo a retirada de toda a água antes da análise fitoquímica (O'FAGAIN; COLLITON, 2017).

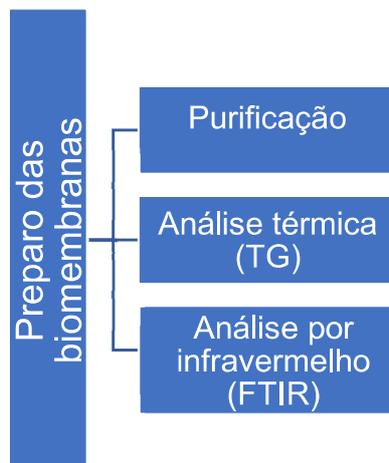
A própolis utilizada neste trabalho foi o Extrato Padronizado de Própolis (EPP-AF®) (massa mole) disponibilizada gentilmente pela empresa Apis Flora Indl. Coml. Ltda. A coleta e o processamento do material foram realizados, a partir de criterioso estudo da matéria-prima proveniente de diferentes regiões Sul e Sudeste do Brasil e a padronização resultante desse estudo, conforme Berreta et al, (2012).

A formulação do extrato de própolis foi realizada no Laboratório P&D da Apis Flora, em Ribeirão Preto-SP. Para a preparação do extrato, previamente, fez-se o teste de solubilidade, dos quais foram utilizados o óleo de rícino, propilenoglicol e polietilenoglicol (PEG 400) com o objetivo de melhor solubilizar o EPP-AF®, para posterior associação ao extrato de mastruz. O melhor solvente para a massa mole de EPP-AF® foi o polietilenoglicol (PEG 400) a 37° C, por 2 horas.

4.1 Produção e análises físico-químicas das biomembranas

Os procedimentos relacionados a produção da membrana de celulose bacteriana e as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Biopolímeros e Biomateriais da Universidade de Araraquara – BIOPOLMAT, situado na cidade de Araraquara em São Paulo, conforme a figura 8.

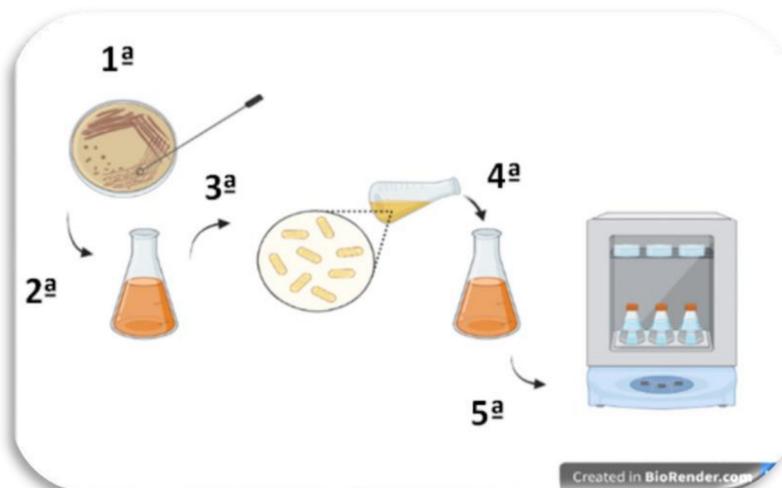
FIGURA 8: Fluxograma dos procedimentos de produção e análises físico-químicas das membranas de celulose bacteriana



Fonte: Rocha, 2022

As membranas de celulose bacteriana foram produzidas utilizando a espécie *Komagataeibacter rhaeticus* (**Figura 9**), conforme descrito por Barud et al, (2013).

FIGURA 9: Processo de elaboração da biocelulose por *K. rhaeticus*.



Legenda: 1ª Seleção da colônia bacteriana; 2ª Cultivo dos inóculos por 3 dias em estufa 28 °C B.O.D.; 3ª Alíquota de 100 mL do meio inoculado por 3 dias em estufa 28 C B.O.D.; 4ª Alíquota de 10 mL do meio inoculado + meio HS estéril; 5ª Incubação por 3 dias estufa 28 C B.O.D

A Figura 10, mostra o cultivo das bactérias, em meios de cultura estática, e no meio de cultura Hestrin e Schramm (HS) líquido. As culturas foram mantidas, sem agitação, por 10 dias, a 28 °C, em Erlenmeyer contendo o meio estéril composto de: glicose 50 g/L, extrato de levedura 4 g/L, fosfato dissódico anidro 2 g/L, sulfato de magnésio drenado com heptano 0,8 g/L e etanol 20 g/L. Após esse período as películas de biocelulose foram obtidas e em seguida foram purificadas por imersão em solução de NaOH 2% para a remoção das bactérias. As biomembranas foram lavadas 6 vezes em água, para neutralização do pH, e depois imersas em etanol 70% por 24 horas.

FIGURA 10: Processo de elaboração da biocelulose por *K. rhaeticus*, etapa de incubação – cultura estática



Para a caracterização das biomembranas foram identificadas as características macroscópicas e físico-químicas. As características organolépticas, de acordo com Anvisa (2004), também foram realizadas.

Os ensaios físico-químicos empregados foram: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) e análise térmica por termogravimetria (TG). Os espectros de FT-IR foram obtidos com um espectrômetro Bruker, modelo VERTEX 70. As amostras foram fixadas diretamente na Espectroscopia para 64 varreduras consecutivas de 400 – 4000 cm^{-1} e coleta de dados. Os espectros obtidos foram plotados em gráfico para avaliar os picos de cada componente do material. Para os ensaios termogravimétricos (TGAs) foram realizados utilizando um equipamento SDT Q600 da TA Instruments, as amostras foram aquecidas a uma taxa constante de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 29 $^{\circ}\text{C}$ a 610 $^{\circ}\text{C}$, sob um fluxo de nitrogênio de 100 mL min^{-1} .

dados foram analisados e plotados em gráficos para avaliação dos estágios de perda de massa, além da eliminação de componentes naturais.

4.2 Formulações dos extratos para incorporação nas biomembranas

As etapas de formulações dos extratos foram realizadas no Laboratório P&D da Apis Flora.

Com o propósito de caracterizar três tipos de biocurativos com os efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes e antimicrobianos, cada BMC foi incorporada, considerando 3 tipos de extratos: extrato de mastruz (MT); extrato de própolis (P); extrato de mastruz associado a própolis (MT+ P).

Para a incorporação nas biomembranas de celulose, uma solução mãe na concentração de 11% foi preparada e a partir disso as concentrações dos extratos foram padronizadas. Sendo assim, as concentrações para o extrato de mastruz (5%); para o extrato de própolis (2,4%) e para o extrato de mastruz associado a própolis (7,4%).

As concentrações utilizadas nessas formulações basearam-se em resultados anteriores de pesquisas realizadas com os extratos de mastruz e própolis. Para tanto, a formulação do extrato de mastruz utilizou doses semelhantes ao descrito por Pinheiro Neto et al, (2017) enquanto que, a formulação do extrato de própolis teve como referência os estudos de Barud et al, (2013).

4.3 Incorporação dos extratos na biomembrana

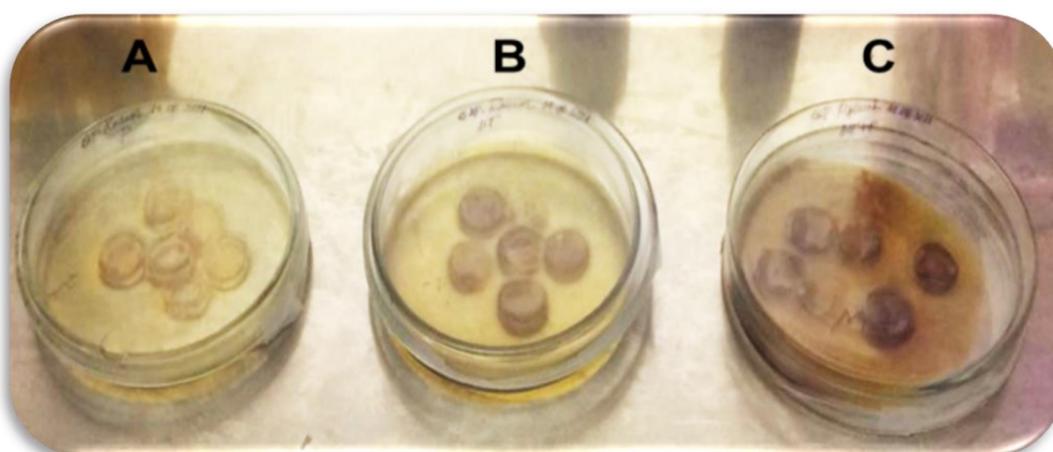
As biomembranas de celulose bacteriana passaram por tratamento em luz ultravioleta, durante 1h para posterior incorporação dos extratos. A incorporação dos extratos nas biomembranas, resultou em 5 grupos, conforme detalhado na **Tabela 1**).

Tabela 1: Identificação dos grupos de biocurativos

Grupos	Tipos de Biocurativos
G1	Biomembrana de celulose bacteriana + MASTRUZ (0,05 mg/mL)
G2	Biomembrana de celulose bacteriana + PRÓPOLIS (0,024 mg/mL)
G3	Biomembrana de celulose bacteriana + MASTRUZ + PRÓPOLIS (0,074 mg/mL)
G4	Biomembrana de celulose bacteriana
G5	Biomembrana de celulose bacteriana + PEG 400

Todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril, em fluxo laminar. Cada biomembrana possui 1,5 cm², antes das incorporações foram esterilizadas em luz U.V por 30 minutos e depois colocadas em placa de Petri 90 x15 mm (**Figura 11**), para proceder a incorporação dos extratos. As membranas foram adicionadas de 1 mL de cada formulação do extrato, de acordo com descrição dos grupos, na tabela 3. Após a realização das incorporações dos extratos, esses biocurativos foram esterilizados por 1h a partir da aplicação de luz U.V em fluxo laminar.

A absorção do extrato pela biomembrana foi realizada por estímulo mecânico, por meio de movimentos circulares com auxílio de uma ponteira de 100 uL, durante 3 minutos. Em seguida, as placas de Petri foram vedadas e incubadas a 28°C, durante 24 horas (BARUD et al., 2013).

FIGURA 11: Incorporação dos extratos nas biomembranas

Legenda: **A=** Biomembrana de celulose bacteriana + PRÓPOLIS; **B=** Biomembrana de celulose bacteriana + MASTRUZ; **C =** Biomembrana de celulose bacteriana + MASTRUZ + PRÓPOLIS

4.4 Testes *in vitro*

4.5.1 Teste de citotoxicidade dos extratos de *C. ambrosioides* e EPP-AF®

A linhagem de fibroblastos GM 07492A foi utilizada para a realização do teste de viabilidade celular e do modelo *in vitro* de cicatrização, uma vez que, os fibroblastos constituem importantes indicadores aos mecanismos de cicatrização *in vitro*. O ensaio foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983) e Liang (2007).

A citotoxicidade foi analisada por meio do método colorimétrico de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) de acordo, com o método de Mosmann (1983). Esse teste avalia a viabilidade da célula a partir da redução do sal tetrazólio (coloração amarela) para formazan (coloração azul escuro), baseando-se na atividade da enzima succinato desidrogenase, atuantes apenas em organismos viáveis as quais possuem mitocôndrias vivas.

Para a realização dos testes foram utilizados fibroblastos de pulmão humano-GM 07492A foram cultivados em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO®) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO®) e gentamicina (40µg/mL). As células foram incubadas em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, por 48 horas, Ao final da incubação foi feito o cálculo de ajuste celular para 1×10^4 células /poço para o plaqueamento na placa de 96 poços. As células foram incubadas em estufa de CO₂ 5%, à 37°C. Após 24 horas, a confluência de 90% e aderência foram avaliadas com auxílio de microscópio invertido com aumento de 20X.

Tratamentos com os extratos (Mastruz, EPP-AF® e Associações) e Espelhos (apenas os extratos) foram adicionados as placas de microtitulação as concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL. Foram utilizados como Controles DMSO 20%; meio de cultura DMEM e PEG 400 em DMEM Após 24 horas os sobrenadantes foram retirados e os poços adicionados 10 uL de MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) 5 mg/mL em PBS (Sigma-Aldrich-EUA,), e as placas foram incubadas em CO₂ 5%, a 37 °C, por 3 horas. Ao final do período de incubação, os sobrenadantes foram descartados e cada um dos poços adicionado 100 µL de álcool etílico. As leituras foram realizadas a 570nm.

Foram utilizados três experimentos independentes (repetições) em duplicatas para avaliar citotoxicidade dos extratos de mastruz, EPP-AF® e suas associações, quanto à dosagem e ao tempo de exposição. Os resultados de absorbância foram convertidos em viabilidade celular, utilizando a equação descrita a seguir.

$$\% \text{ CV} = (\text{TA médio} / \text{CG médio}) * 100$$

* CV = viabilidade celular; TA = absorbância testada; CG = grupo controle

4.5.2 Teste de atividade antibacteriana das biomembranas

O teste antibacteriano teve como critério duas espécies bacterianas, frequentemente, associadas às infecções de feridas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *E.coli* ATCC 25923.

O método de difusão em disco foi empregado neste estudo, com algumas modificações, que correspondeu na introdução das biomembranas incorporadas com os extratos (biocurativos) ao invés dos discos (**FIGURA 12**). As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina estéril 0,85%, com turbidez equivalente a um padrão de 0,5 McFarland (aproximadamente 10^8 UFC mL). O teste foi realizado conforme descrito por National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2003.

FIGURA 12: Desenho experimental do teste antibacteriano



legenda: 1 – biomembrana com extrato de própolis; 2 – biomembrana com extrato de mastruz; 3 – biomembrana com extrato de mastruz + própolis; 4 – biomembrana com PEG 400; 5 – biomembrana

Nos ensaios foram utilizadas biomembranas de celulose incorporadas com os extratos de mastruz e própolis em diferentes concentrações. Sendo assim, as biomembranas foram categorizadas nos 5 grupos descritos na Tabela 3.

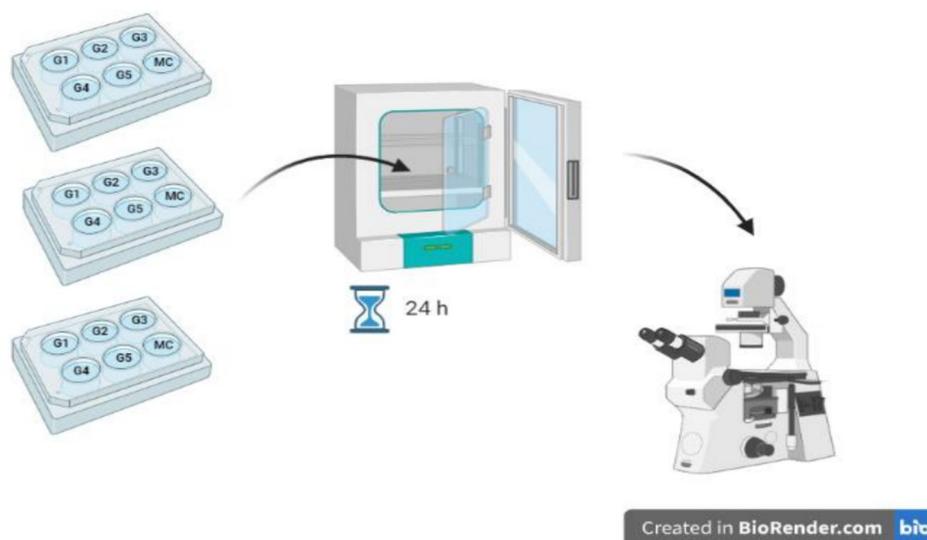
Para a medição dos halos, o protocolo foi realizado de acordo com Barud et al, (2013). As placas foram incubadas a 35 °C, em intervalos de 24, 48 e 72 horas, quando, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos, com auxílio de um paquímetro (ZAAS ®).

4.5.3 Teste de atividade cicatrizante *in vitro*

Para análise da atividade cicatrizante *in vitro* das biomembranas foi usado O ensaio do *scratch assay*, conforme descrito por Liang et al, (2007). Os fibroblastos-GM de pulmão humano foram cultivados em garrafas estéreis de poliestireno, com meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich) contendo 10% de SFB. Em seguida, foram realizadas as subculturas utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas. As células foram transferidas para uma placa de 6 poços e mantidas em estufa de CO₂, à 37°C, até a formação da confluência de 90% com concentrações celulares 5X10⁵ células/mL em cada poço. Então, o sobrenadante foi desprezado e foi realizado um risco em linha reta na região mediana da placa, com a ponta da pipeta de 100µL Axigen®, promovendo a formação de uma “ferida”.

Os debris foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Então, os fibroblastos foram tratados com as biomembranas, conforme os grupos listados na tabela 3, para avaliação do crescimento celular por cima do risco, como mostra a Figura 13. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

FIGURA 13: Desenho de placa do teste *in vitro* “Wound Healing” com células linhagem GM – Fibroblastos após a realização do risco (“ferida”), considerando a aplicação das biomembranas.



Legenda: **G1** (Grupo 1 = Mastruz); **G2** (Grupo 2 = Própolis); **G3** (Grupo 3 = Mastruz + Própolis); **G4** (Grupo 4 = polietilenoglicol); **G5** (Grupo 5 = Celulose); **G6 MC** = Meio + Célula).

Para observação dos resultados foram feitas imagens com microscópio invertido. Essas fotos foram feitas nos tempos de 0 e 24 horas após a inclusão dos tratamentos que tem como objetivo comparar a diferença da distância entre as bordas nos intervalos determinados.

A migração celular foi medida com o software Image J. O percentual de migração de feridas foi calculado com base na redução da área do risco e os dados foram expressos com médias e desvio padrão após a aplicação da fórmula (HADDADI; TAMRI; JOONI, 2019).

$$\% = \frac{(\text{área do arranhão 0h} - \text{área do arranhão 24h}) \times 100}{\text{Área do arranhão 0 h}}$$

3.6 Análise Estatística

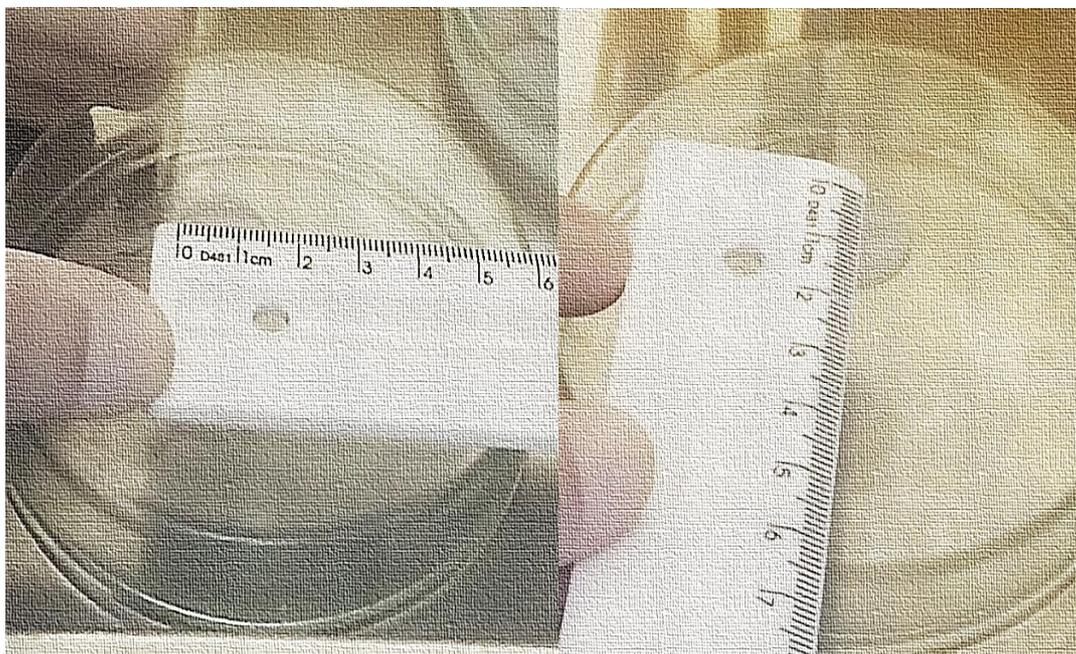
A análise estatística foi determinada usando a estatística descritiva e apresentação dos resultados como média e desvio padrão. Para as diferenças entre os grupos foi utilizado o ANOVA, sendo consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Toda a análise foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das biomembranas

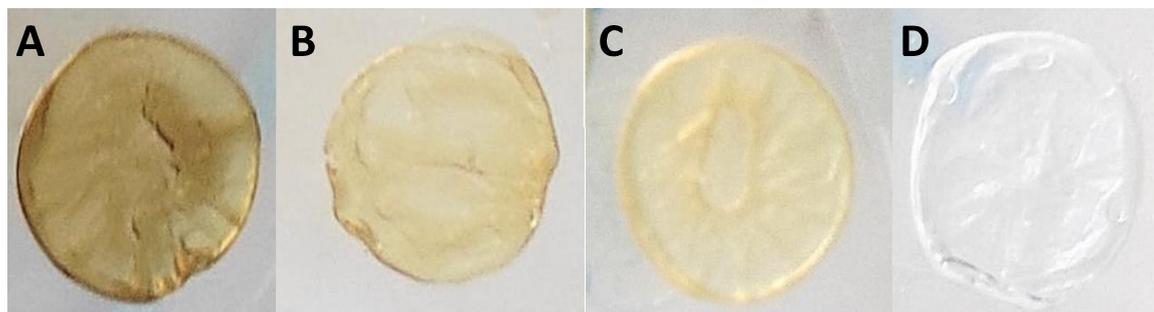
A figura 14 apresenta as características macroscópicas das biomembranas de celulose bacteriana sem a incorporação dos extratos, ou seja, correspondem nas biomembranas de celulose bacteriana que foram obtidas para receber, posteriormente, os extratos de mastruz a 5%, própolis a 2,4 % e suas associações referente a concentração de 7,4%. Sendo assim, apresenta-se de forma circular com a equivalência de 1,5 cm², na cor branca, aspecto opaco e úmido.

FIGURA 14: Biomembranas de celulose bacteriana (*K.rhaeticus*) prontas para a incorporação com os extratos.



A partir disso, as membranas de celulose bacteriana foram incorporadas com os extratos e, com isso, obteve-se os bioprodutos também chamados de biocurativos (**Figura 15**), onde suas características macroscópicas estão descritas na tabela 4.

FIGURA 15: Biocurativos de celulose bacteriana incorporados com extrato de mastruz e APP-AF®



Legenda: A – biocurativo de mastruz e própolis; B – biocurativo de mastruz; C - biocurativo de própolis; D – biocurativo controle (celulose bacteriana com veículo PEG 400).

Tabela 2: Caracterização macroscópica dos biocurativos

BIOCURATIVOS	Cor	Aspecto	Umidade	Oleosidade	Facilidade de se desprender do suporte
A	verde brilhante	translúcido	ausente	presente	Intensa
B	verde claro	translúcido	ausente	presente	Intensa
C	amarelo claro	translúcido	ausente	presente	Intensa
D	branco	translúcido	ausente	presente	Intensa

BIOCURATIVOS	Uniformidade	Presença de bolhas	Presença de rachaduras	Aparência quebradiça	Flexibilidade
A	intensa	ausente	ausente	ausente	Intensa
B	intensa	ausente	ausente	ausente	Intensa
C	intensa	ausente	ausente	ausente	Intensa
D	intensa	ausente	ausente	ausente	Intensa

Legenda: A – biocurativo de mastruz e própolis; B – biocurativo de mastruz; C - biocurativo de própolis; D – biocurativo controle (celulose bacteriana com veículo PEG 400).

A tabela 3 estão os resultados referentes ao teste de estabilidade dos biocurativos, considerando apenas as características organolépticas do bioproduto, conforme os critérios preconizados pela ANVISA (2004).

Tabela 3: Características organolépticas dos biocurativos em temperatura ambiente, de acordo com a ANVISA

Biocurativos	Tempo de armazenamento (TA)	Cor	Aspecto
A	T0 (SA) T7 (SA) T15 (SA) T30 (SA) T60 (SA) T90 (SA)	SA	AS
B	T0 (SA) T7 (SA) T15 (SA) T30 (SA) T60 (SA) T90 (SA)	SA	AS
C	T0 (SA) T7 (SA) T15 (SA) T30 (SA) T60 (SA) T90 (SA)	SA	AS
D	T0 (SA) T7 (SA) T15 (SA) T30 (SA) T60 (SA) T90 (SA)	SA	AS

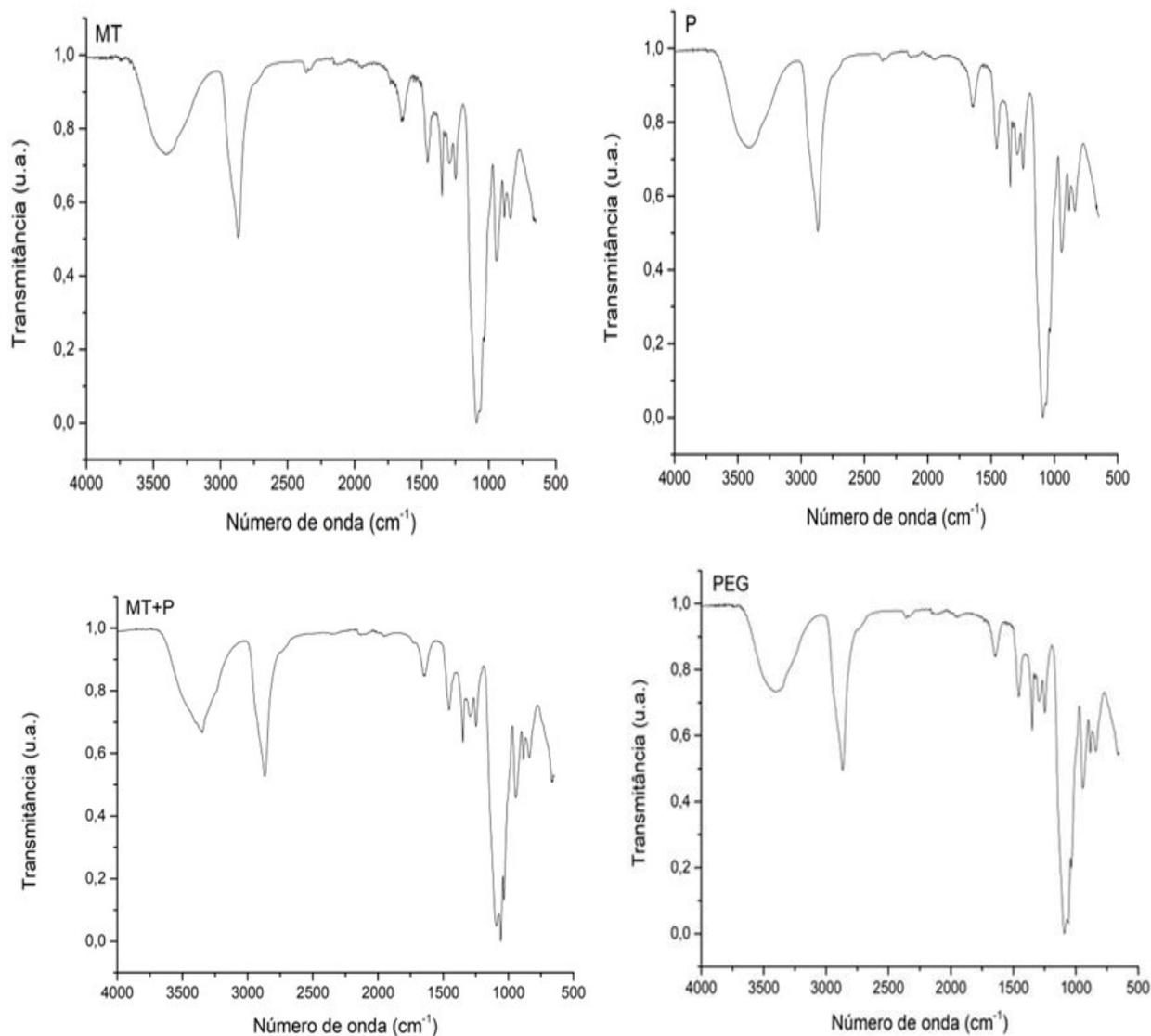
Legenda: A – biocurativo de mastruz e própolis; B – biocurativo de mastruz; C - biocurativo de própolis; D – biocurativo controle (celulose bacteriana com veículo PEG 400); T0 = 0 dias; T7= , ; T15 = 15 dias; T30= 30 dias; T60 = 60 dias; T90 = 90 dias; SA=Sem Alteração; LM=Levemente modificado; M=Modificado; LM=intensamente Modificado; P=Precipitado S=Separado.

A figura 16 apresenta a caracterização dos biocurativos por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), os biocurativos produzidos foram analisados para identificar as possíveis interações entre os componentes da formulação, bem como para a identificação da composição química. A identificação da composição química dos biocurativos por FT-IR é realizada com base nos grupos funcionais provenientes dos espectros de absorção característicos de cada biocurativo, ou seja, o espectro infravermelho é formado pela absorção de radiação eletromagnética na frequência que corresponde aos grupos específicos de bandas químicas de uma molécula, sendo a banda espectral caracterizada por sua frequência e amplitude.

Os espectros que apresentaram bandas acentuadas foram entre 3500 cm⁻¹, estiramento O-H; e 3200 cm⁻¹, estiramento O-H; 1200 cm⁻¹, estiramento C-C; e 1000 cm⁻¹, estiramento C-O, porém, pode-se observar outras bandas

com picos menos acentuados, que corresponderam entre 1500 cm^{-1} , estiramento C=O; a 1300 cm^{-1} , estiramento C-O; e entre 900 cm^{-1} , dobramento C-H; a 500 cm^{-1} , estiramento C-I.

FIGURA 16: Caracterização dos biocurativos por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

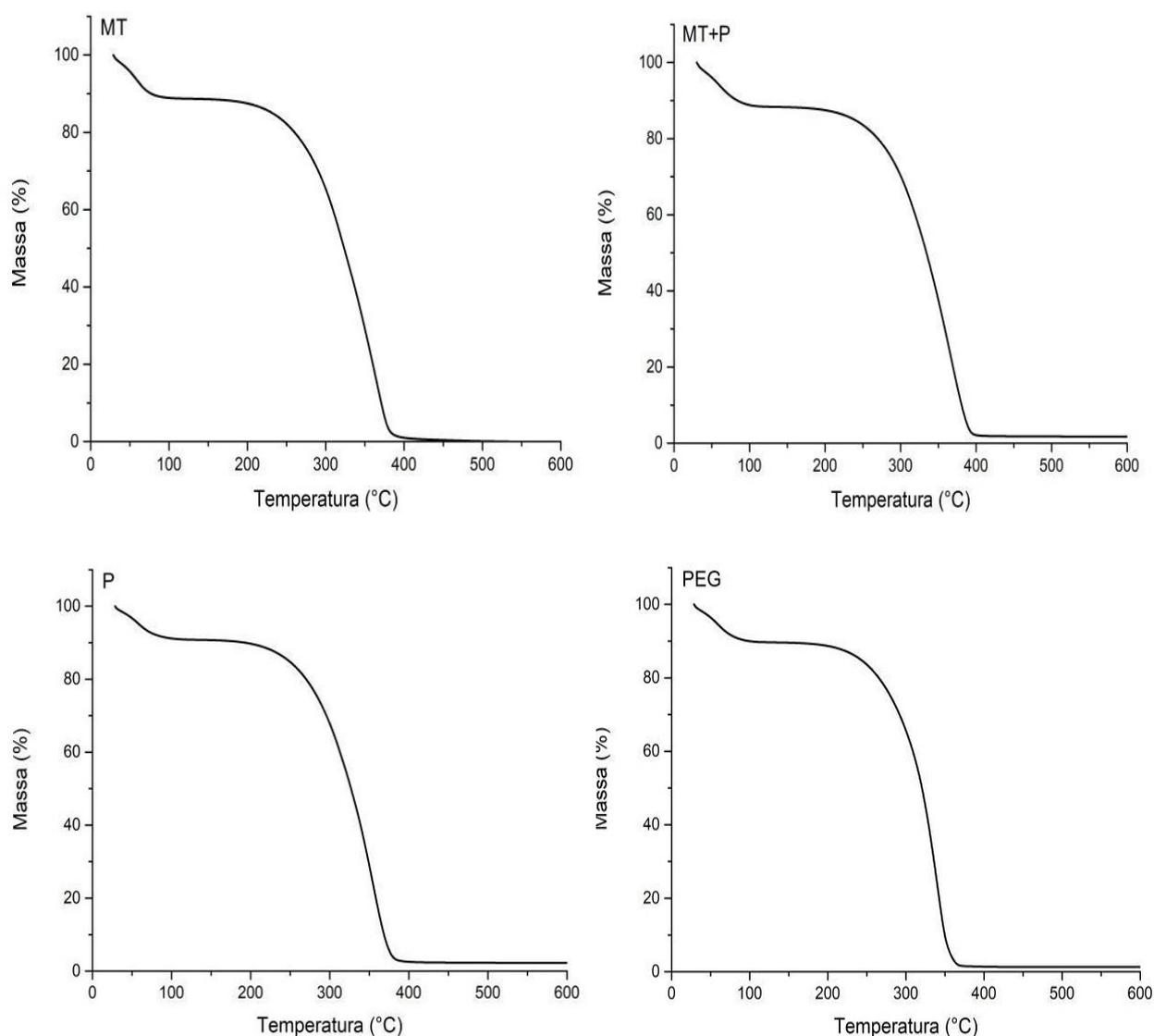


Legenda: MT – biocurativo de mastruz; MT + P – biocurativo de mastruz e própolis; P - biocurativo de própolis; PEG – biocurativo controle (celulose bacteriana com veículo PEG 400).

da natureza dos biocurativos por medidas de estabilidade térmica e da cinética de degradação. As curvas da Análise Termogravimétrica (TG), o ponto máximo

da TG indica a variação mínima e/ou nula da massa da amostra em função da temperatura, e o ponto mínimo a variação máxima, conseqüentemente indicando o ponto final da degradação do biocurativo.

FIGURA 17: Caracterização dos biocurativos por análise térmica por termogravimetria (TG)



Legenda: MT – biocurativo de mastruz; MT + P – biocurativo de mastruz e própolis; P - biocurativo de própolis; PEG – biocurativo controle (celulose bacteriana com veículo PEG 400);

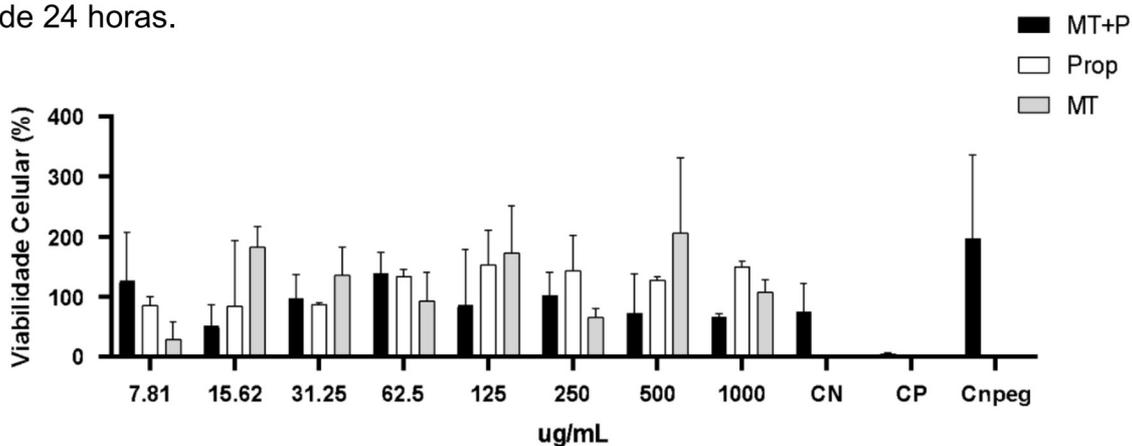
5.2 Testes de citotoxicidade

Os extratos de mastruz e própolis não afetaram a viabilidade celular, portanto, estão isentos de componentes químicos capazes de provocar algum tipo de irritação na pele. O teste de viabilidade celular (**Figura 18**) foi avaliado pelo método MTT, onde demonstra o percentual de viabilidade celular em função do tempo de exposição a diferentes concentrações dos extratos de mastruz, EPP-AF® e suas associações. O ensaio de MTT permite observar e diferenciar substâncias irritantes das potencialmente não irritantes, ou seja, as substâncias irritantes são identificadas por sua capacidade de diminuir a viabilidade celular em 50% ou mais, enquanto que, os compostos que reduzem a viabilidade celular em menos de 50% são consideradas não irritantes.

Foram realizadas diluições seriadas para a obtenção de oito concentrações, a menor concentração de 7,81 µg/mL até 1000 µg/mL. Sendo assim, a figura 20 mostra o comportamento dos extratos sob os fibroblastos, que configura em estimulação celular, especialmente, caracterizado pelo mastruz (MT) de forma isolada.

Com o propósito de verificar a citotoxicidade dos extratos em relação aos fibroblastos, pode-se destacar que os tratamentos apresentaram perfil estimulatório, quando comparado ao controle positivo (CP), inclusive na concentração de 1000 µg/mL que é relatada como uma concentração elevada para esse tipo de teste.

FIGURA 18: Teste de viabilidade celular por MTT em linhagens de fibroblastos com extrato de mastruz, EPP-AF® e suas associações, considerando o período de 24 horas.



Legenda: MT+ P= mastruz + própolis; prop = própolis; MT = mastruz; CN = controle negativo (célula GM (fibroblastos) + meio DMEN); CP = controle positivo (célula GM - fibroblastos + meio dmen + DMSO 20%); CNPEG = controle negativo (célula GM -fibroblastos + meio DMEN + PEG 400). **Fonte:** Rocha, 2021.

5.1.3 Atividade antibacteriana das biomembranas

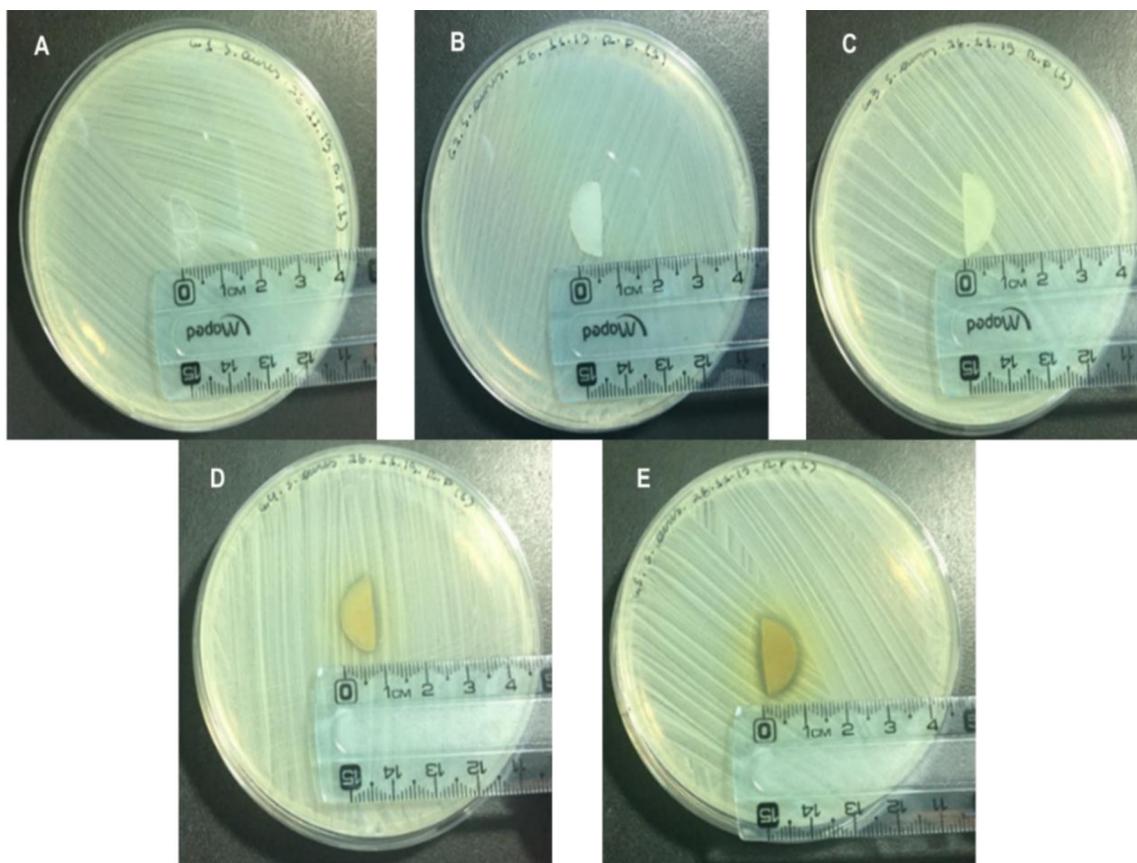
O teste antibacteriano foi realizado em duas etapas. Na primeira, as biomembranas foram cortadas pela metade para a realização do teste contra a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (**Figura 19**) e na segunda etapa, as biomembranas foram utilizadas inteiras, considerando os testes diante da cepa de *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (**Figura 20**).

A figura 19 apresenta o teste antibacteriano qualitativo com destaque para a observação da ausência ou presença do halo de inibição frente a *S. aureus* ATCC 25923. Apenas os grupos dos tratamentos (**BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®] e **BMC + P + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®]), formaram o halo inibitório (**Figura 19: D-E**), enquanto que, os demais grupos não apresentaram formação da zona de inibição (**Figura 19: A-C**), que são correspondentes aos grupos controles (**CRTL1** - Biomembrana de celulose bacteriana e **CRTL2** -Biomembrana de celulose bacteriana com o veículo PEG 400) e ao grupo tratamento (**BMC + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz).

Nesse teste antibacteriano, os halos inibitórios expressos pelos grupos tratamentos **BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®] e **BMC + P + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®] (**Figura 19: D-E**) sugere-se a realização de testes que possam avaliar o efeito sinérgico do extrato de mastruz em relação ao extrato de própolis, pois pode-se observar um halo maior e mais brilhante (**Figura 21:E**), se comparado ao grupo (**Figura 19: D**).

Já os grupos controles (**Figura 19: A-B**), a biomembrana de celulose está sem nenhum tipo de aditivo e a biomembrana de celulose com o veículo PEG 400, de acordo com o esperado, não foi observado a formação de halo inibitório em nenhum desses grupos, pois a celulose bacteriana e o veículo PEG 400 não apresentam efeito antimicrobiano.

FIGURA 19: Teste antibacteriano – ausência e presença do halo de inibição utilizando BMC com extratos de mastruz, própolis EPP-AF® e associações no tempo de 24 horas em *S. aureus* ATCC 25923.



Legenda: **A = CRTL1** - Biomembrana de celulose bacteriana; **B = CRTL2** - Biomembrana de celulose bacteriana com o veículo PEG 400; **C = BMC + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz; **D = BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF®; **E = BMC + MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF®

A **Tabela 4** apresenta os resultados quantitativos do teste antibacteriano realizado. Para tanto, na **tabela 4** a média e o desvio padrão dos halos de inibição das biomembranas incorporadas com os extratos de mastruz, própolis EPP-AF® e associações durante o período de 24 horas a cepas de *S. aureus* ATCC 25923, considerando também as diferenças estatísticas entre os grupos por meio da ANOVA.

Os resultados apresentaram diferenças estatísticas significativas nos grupos controles (**CRTL1** - Biomembrana de celulose bacteriana; **CRTL2** - Biomembrana de celulose bacteriana com o veículo PEG 400) em relação aos tratamentos (**BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com

extrato de própolis EPP-AF[®]; **BMC + MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®]). O grupo tratamento (**BMC + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz) foi significativo em relação aos grupos tratamentos (**BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®] e **BMC + MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®]), enquanto que, o grupo tratamento (**BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®]) foi significativo em relação ao tratamento (**BMC + MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®])

Tabela 4: Média e Desvio Padrão do teste antibacteriano em relação a medida do halo formado em mm² das biomembranas em culturas de 24 horas frente as cepa padrão de *S.aureus* ATCC 25923.

CEPA PADRÃO	CONTROLE		TRATAMENTO		
	*CTRL1	#CTRL2	\$ BMC + MT	% BMC + P	BMC + MT + P
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	*\$10,7 ± 1	*#%13,4 ± 0,8

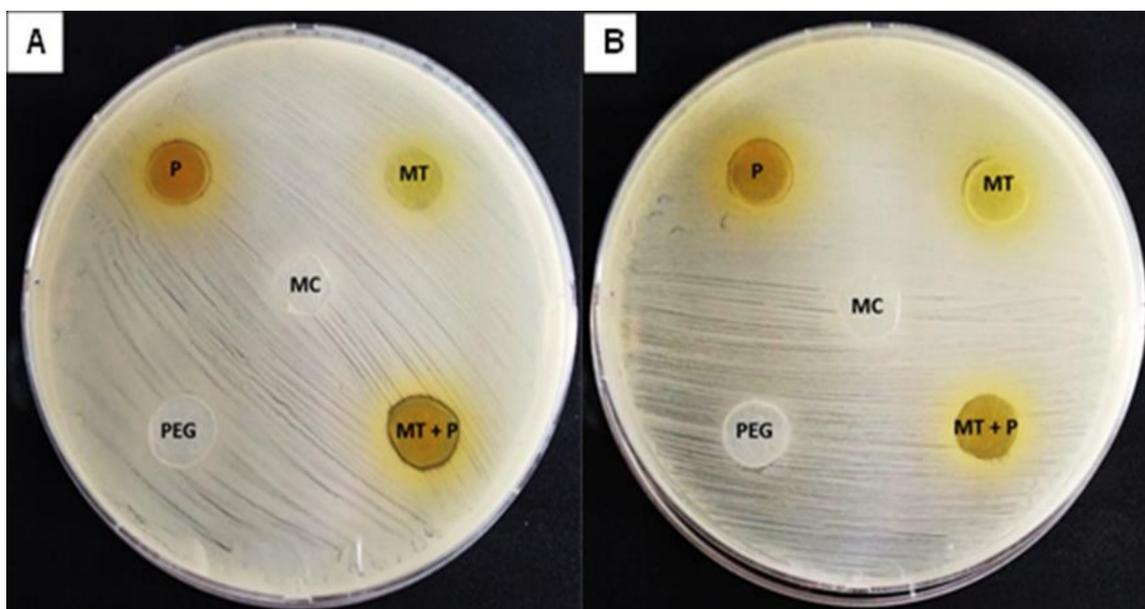
Legenda: **CRTL1** - Biomembrana de celulose bacteriana; **CRTL2** - Biomembrana de celulose bacteriana com o veículo PEG 400; **BMC + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz; **BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®]; **BMC + MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®] ANOVA (n = 3; *p<0,05; #p<0,05; \$p<0,05; %p<0,05).

A Figura 20 expressa o teste antibacteriano qualitativo que foi realizado com as bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Esses resultados sugerem a realização de testes para avaliação de efeitos bacteriostáticos dos extratos, como também, testes de avaliação da estabilidade dos bioativos dos extratos.

Os tratamentos (**MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz, **P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®] e **MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®]) expressaram sutilmente a formação de halos, porém, com prováveis efeitos bacteriostáticos e não bactericidas como observado no teste antibacteriano feito em 2019 (**Figura 20: A-B**)

FIGURA 20: Teste antibacteriano – ausência e presença do halo de inibição utilizando BMC com extratos de mastruz, própolis e associações no tempo de 24 horas em *S.aureus* ATCC 25923 e *E.coli* ATCC 25922



Legenda: **A** - *S.aureus* ATCC 25923; **B** - *E.coli* ATCC 25922; **MC** - Biomembrana de celulose bacteriana; **PEG** - Biomembrana de celulose bacteriana com o veículo PEG; **MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz; **P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®]; **MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®]

A **Tabela 5** apresenta os resultados quantitativos, tendo em vista a média e o desvio padrão dos halos formados a partir das biomembranas incorporadas com os extratos, considerando o período entre 24, 48 e 72 horas em relação a medida do halo formado em mm² frente as cepas de *S.aureus* ATCC 25923 e

E. coli ATCC 25923, bem com as diferenças estatísticas entre os grupos por meio da ANOVA.

Tabela 5: Média e Desvio Padrão do teste antibacteriano em relação a medida do halo formado em mm² das biomembranas em culturas de 24, 48 e 72 horas frente as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922.

CEPA PADRÃO	TEMPO (horas)	CONTROLE		TRATAMENTO		
		*CTRL1	#CTRL2	\$BMC + MT	%BMC + P	BMC + MT + P
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	24	0 ± 0	0 ± 0	**21,0 ± 1,0	**\$23,2, ± 1,6	**22,0 ± 1,0
	48	0 ± 0	0 ± 0	**23,0 ± 0	**23,4 ± 0,5	**%22,6 ± 0,5
	72	0 ± 0	0 ± 0	**22,2 ± 1,7	**21,2 ± 0,4	**21,4 ± 1,3
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	24	0 ± 0	0 ± 0	**21,0 ± 0	**23,7 ± 1,5	**22,6 ± 1,3
	48	0 / ± 0	0 ± 0	**21,6 ± 2,1	**\$24,4 ± 0,5	**22,6 ± 0,8
	72	0 ± 0	0 ± 0	**22,6 ± 0,5	**23,6 ± 1,5	**23,4 ± 1,5

Legenda: CTRL1 - Biomembrana de celulose bacteriana; CTRL2 - Biomembrana de celulose bacteriana com o veículo PEG 400; BMC + MT - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz; BMC + P - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis; BMC + MT + P - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF®. ANOVA (n = 3; *p<0,05; #p<0,05; \$p<0,05; %p<0,05).

Os resultados apresentaram diferenças estatísticas significativas no tempo de 24,48 e 72 horas para as cepas *E. coli* (ATCC 25922) e de *S. aureus*

(ATCC 25923) nos grupos controles (**CRTL1** - Biomembrana de celulose bacteriana; **CRTL2** - Biomembrana de celulose bacteriana com o veículo PEG 400) em relação aos tratamentos (**BMC + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz; **BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®]; **BMC + MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®]).

No entanto, para a cepa *E. coli* (ATCC 25922) também foi significativo entre os tratamentos no tempo de 24 horas (**BMC + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e **BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®]). Enquanto que, no tempo de 48 horas foi significativo entre os tratamentos (**BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis; **BMC + MT + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e própolis EPP-AF[®]).

No caso da cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) houve estatística significativa entre os tratamentos no tempo de 48 horas (**BMC + MT** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de mastruz e **BMC + P** - Biomembrana de celulose bacteriana incorporada com extrato de própolis EPP-AF[®]). Nas leituras no tempo de 72 horas não apresentaram estatística significativa.

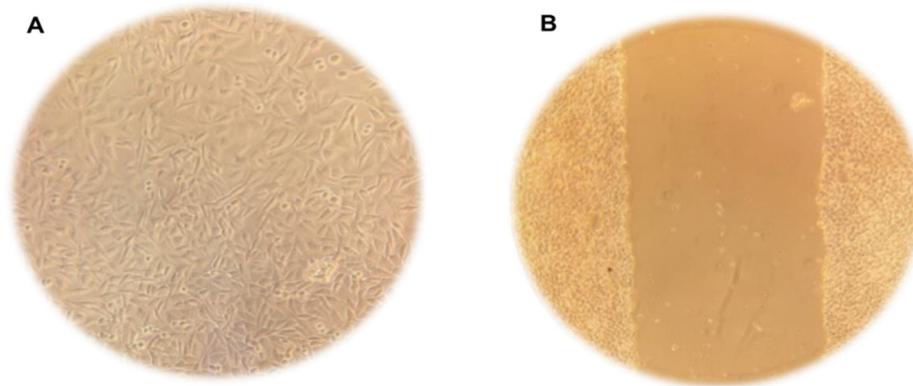
5.4 Atividade cicatrizante das biomembranas

Os ensaios de migração celular foram realizados com o objetivo de simular o fechamento de uma ferida, esse tipo de ensaio também é conhecido por “*strach assay*” ou ensaio por ranhadura.

A Figura 21 apresenta os resultados da cultura celular de fibroblastos, onde a **Figura 21 – A** indica o resultado da cultura celular estabelecida, ou seja, 90% dos fibroblastos foram bem aderidos na placa, e com isso, o arranhão pode ser feito para representar a “ferida” (**Figura 21 - B**). No período de 24h esperava-

se a migração dos fibroblastos que seria a redução da distância da área “lesionada”, porém, isso não aconteceu no período analisado.

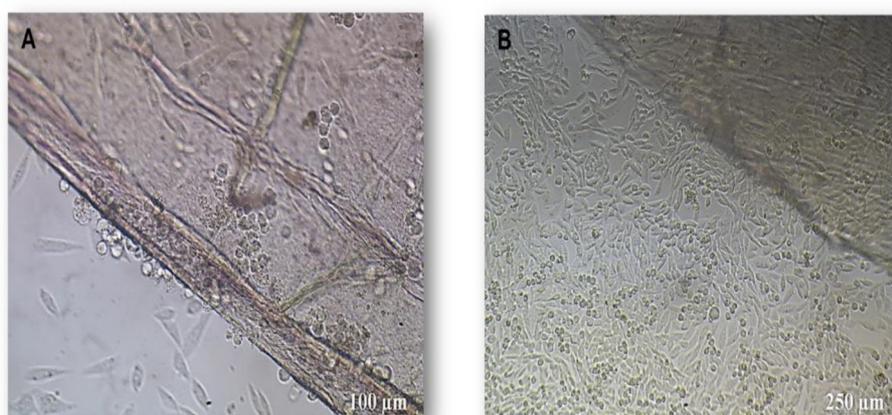
FIGURA 21: Ensaio de *scratch assay*, tempo 0h. Microscopia óptica em objetiva de 10X das células linhagem GM – Fibroblastos de pulmão Humano



Legenda: **A** – cultura estabelecida sem ferida; **B** – cultura estabelecida após a realização do risco (“ferida”)

Por outro lado, a figura 22 refere-se aos ensaios de migração celular, considerando apenas o uso da biomembrana de mastruz que demonstrou atividade de aderência celular, fator importante para os aspectos de biocompatibilidade do biocurativo.

FIGURA 22: Microscopia óptica das células linhagem GM – Fibroblastos de pulmão Humano com adesão à biomembrana de mastruz



Legenda: **A** – Microscopia óptica em objetiva de 20x da biomembrana de mastruz em cultura celular; **B** – Microscopia óptica em objetiva de 10x da biomembrana de mastruz em cultura celular

A **tabela 6** apresenta os resultados quantitativos referentes aos testes de cicatrização *in vitro* realizados, tendo em vista os tempos de análises de 0 horas e 24 horas.

Tabela 6: Ensaio de migração celular, considerando o tempo 0 e 24 horas de observação com dados gerados no *Image J*

Tempo de leitura (horas)	Distância (mm)	Redução da distância (%)
* Tempo 0 h controle	129.752	0
# Tempo 24h MT	130.556	-1
\$ Tempo 24 P	* # 125.563	* # 3.31
Tempo 24 MT + P	* # \$ 80.048	* # \$ 38.29

Legenda: Controle (Meio + Célula); MT (Biomembrana de Mastruz); P (Biomembrana de Própolis); MT + P (Biomembrana de Mastruz + Biomembrana de Própolis). ANOVA (n = 3; *p<0,05; #p<0,05; \$p<0,05)

Sendo assim, os grupos controles (tempo 0 h) foram significativos em relação aos grupos do tratamento (tempo 24h P e tempo de 24h MT + P). Os grupos do tratamento (tempo de 24h MT) apresentaram-se significativos frente aos tratamentos (tempo 24h P e tempo de 24h MT + P). Os grupos do tratamento (tempo 24h P) mostraram-se significativos diante dos grupos do tratamento (tempo 24h MT + P).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram obtidas biomembranas de celulose bacteriana incorporadas com formulação de extratos de mastruz nas concentrações de 5%, própolis (EPP-AF ®) a 2.4% e as associações desses extratos correspondentes a 7.4%, os resultados obtidos apontam um biocurativo que apresenta biocompatibilidade, ação antibacteriana e cicatrizante, sendo um potencial para aplicação em feridas.

As características macroscópicas desses curativos, apresentaram coloração típica de cada extrato, o que indica uma homogeneidade na distribuição das partículas por toda a biomembrana; o aspecto é translúcido; apresentam intensa flexibilidade, facilidade de se desprender do suporte e uniformidade; presença de oleosidade por conta do veículo PEG 400 utilizado; ausência de bolhas, rachaduras e de aparência quebradiça. Esses resultados são semelhantes àqueles encontrados por Basílio (2008), que demonstraram macroscopicamente membranas produzidas a partir de géis dos polímeros pectina e carboximetilcelulose sódica (NaCMC) para a incorporação de extrato de própolis vermelha.

Em relação aos aspectos organolépticos não foram observadas alterações na cor e no aspecto do biocurativo, sendo então, levado em consideração os tempos de armazenamento entre 0 a 90 dias em temperatura ambiente. Tal resultado corrobora o que preconiza a Anvisa (2004), pois as características organolépticas fornecem indicadores para avaliar a estabilidade de um produto, e conseqüentemente, subsídios de aceitação ao consumidor, ou seja, é capaz de prever o comportamento do produto através de um determinado intervalo de tempo e sob condições ambientais desde a fabricação até o término da validade. Sendo assim, os testes realizados para esses parâmetros indicam que os biocurativos, encontram-se em boas condições de estabilidade.

No âmbito da caracterização físico-química temos as análises por FT-IR e a termogravimetria. Nas análises dos espectros de absorção pelo FT-IR foi possível observar na região entre 3500 cm⁻¹ a 3200 cm⁻¹ e 1200 cm⁻¹ a 1000 cm⁻¹, as bandas se apresentaram mais intensas, enquanto que, na região entre 1500 cm⁻¹ a 1300 cm⁻¹ e entre 900 cm⁻¹ a 500 cm⁻¹, essas bandas se

apresentaram em menor intensidade. No que tange nos ensaios termogravimétricos observa-se que as curvas de TG da plataforma PEG (BMC com o veículo) comparada com as plataformas tratamento, MT,P e MT+P apresentaram perfis muito similares. No caso de todas as plataformas, nota-se perda de massa relacionadas à degradação da biocelulose que ocorre acima de 200 °C. A plataforma PEG, P e MT+P, pode-se observar resíduo mássico em 600 °C, já para a plataforma MT em 600 °C não houve resíduo de massa.

A espectroscopia na região do infravermelho corresponde nas interações entre as moléculas ou átomos e a radiação eletromagnética, provocando vibrações de acordo com a amplitude das ligações covalentes existentes na molécula. Por ser uma técnica simples, rápida e não destrutiva vem sendo utilizada na caracterização de compostos orgânicos (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2013).

É fundamental mencionar que a região espectral do infravermelho, tem ocorrência em três categorias principais, baseadas nas suas três regiões espectrais. A região do infravermelho médio (MIR) é a mais usada, se estende entre 670 a 4000 cm^{-1} , cujos espectros são aplicados tanto para análise qualitativa como quantitativa. A região do infravermelho próximo (NIR), de 4000 a 14000 cm^{-1} , também é utilizada na determinação quantitativa. Já a região do infravermelho distante tem sido usada principalmente na determinação de estruturas de espécies inorgânicas e organometálicas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Os espectros observados nos resultados percebem-se que devido ao fato do extrato hidroalcolólico de bruto de *C. ambrosioides*, o EPP-AF® e a biocelulose apresentarem muitos grupos funcionais coincidentes, os espectros apresentam as mesmas vibrações, ou ainda ter ocorrido a sobreposição de bandas que vibram na mesma intensidade. Esses achados corroboram com Medeiros (2016), que obteve membranas de quitosana incorporadas com mastruz e mostrou que podem ser utilizados como potencial agente osteoindutor a partir da promoção de aumento dos osteoblastos, o que é relevante na cicatrização, uma vez que, esse processo contribui para a regeneração do tecido ósseo.

A radiação infravermelho não possui energia suficiente para provocar transições eletrônicas, por esse motivo, apresenta como fundamento a teoria

corpúscular, a radiação eletromagnética que provoca as vibrações é quantizada, envolvendo fótons de energia específica, ou seja, pacotes de energia. (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009), entretanto, a sua absorção ocorre em frequências específicas para cada grupo funcional, devido ao arranjo característico de átomos e ligações presentes na molécula (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2013). As absorções de grupos funcionais químicos variam em uma larga faixa porque as bandas provêm de interações complexas com moléculas, as bandas de absorção correspondem majoritariamente a um único modo vibracional. Além disso, algumas bandas de absorção permanecem razoavelmente fixas no espectro como, por exemplo, as provenientes dos modos de deformação axial de C-H, O-H e C=O, independentemente de possíveis interações. A posição exata da banda de absorção e as mudanças nos contornos das bandas revelam detalhes importantes da estrutura da molécula (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1994).

Silverstein e Webster (2000) consideram duas bandas mais importantes para o exame preliminar dos espectros, as regiões de 900 a 650 cm^{-1} e de 4000 a 1300 cm^{-1} . A ausência de bandas fortes na região de 900 a 650 cm^{-1} indica, geralmente, que a estrutura em questão não contém anéis aromáticos que produzem bandas intensas, originadas das deformações angulares dos anéis. A região de 4000 a 1300 cm^{-1} é chamada região dos grupos funcionais, na qual ocorrem as absorções que correspondem a grupos funcionais importantes, como O- como O- H, N-H e C=O. A região intermediária do espectro, 1300-900 cm^{-1} é uma região conhecida como a região da “impressão digital”, porém o espectro nela observado inclui muitas bandas e os modos de vibração são geralmente acoplados, características estas que corroboram com o que foi encontrado, uma vez que, tanto o mastruz quanto a própolis são ricas em compostos aromáticos, como por exemplo, os flavonóides e polifenóis.

Considerando a identificação da composição da biomembrana para a incorporação dos extratos utilizados, que no caso foi a nanocelulose que também é chamada de biocelulose os resultados encontrados corroboram com os observados por Barud (2015), que realizou a caracterização estrutural da membrana de celulose por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR), sendo as principais atribuições que caracterizam a celulose: 3500 cm^{-1} , estiramento OH; 2900 cm^{-1} : estiramento CH de alcanos e

estiramento assimétrico CH₂; 2700 cm⁻¹: estiramento simétrico CH₂; 1640 cm⁻¹ : deformação OH; 1400 cm⁻¹: deformação CH₂; 1370 cm⁻¹: deformação CH₃; 1340 cm⁻¹: deformação OH e 1320-1030 cm⁻¹ : deformação.

Se tratando dos compostos presentes na própolis, os nossos resultados corroboram com Basílio (2008), onde fez análise por FT-IR e obteve bandas características do extrato de própolis e da membrana incorporada com o extrato de própolis. Como característica “apenas” do extrato de própolis o espectro mostrou estiramento característico de hidrogênio sem grupo hidroxila (O-H), típicos de compostos fenólicos a 3392 cm⁻¹; 1620, 1506 e 1454 cm⁻¹ bandas correspondentes aos estiramentos C=C de anel aromático; 1030 cm⁻¹ estiramento da ligação C-O-C de éter ou éster aromáticos (para flavonóides), e a presença da banda a 835 cm⁻¹ correspondente à deformação angular fora do plano de C-H aromático.

Na preparação das membranas de celulose incorporadas com extratos, Barud et al (2013), formularam o extrato de própolis a partir de uma solução a 11% de Extrato Padronizado de Própolis Verde (EPP-AF®) (p/v), sendo respectivamente, 1.2%, 2.4% e 3.6% (p / v), porém, foi a concentração de 2.4% que apresentou melhor atividade antibacteriana contra *S.aureus* ATCC 25923, o que corrobora com esta tese, que utilizou membrana de celulose incorporada com extrato de própolis (EPP-AF®) na concentração de 2.4% contra *S.aureus* ATCC 25923, mas além disso, também foi testado para a cepa *E. coli* (ATCC 25922), onde pode ser observado um potencial efeito de inibição do crescimento bacteriano.

Nos testes antibacterianos avaliamos a ação antimicrobiana das biomembranas em *S.aureus* ATCC 25923, bactéria Gram-positiva, e *E.coli* ATCC 25922, bactéria gram-negativa. Os resultados mostraram que a atividade antibacteriana ocorreu somente em presença das biomembranas contendo própolis (EPP-AF®), associado ou não ao mastruz, esse resultado mostra indicação clínica das biomembranas compostas por EPP-AF®, seja de modo em associação ao mastruz ou isolado neste biomaterial, tanto para uso humano e veterinário. Vale ressaltar que a biomembrana de mastruz não apresentou ação bactericida, porém pode ter apresentado ação bacteriostática, no entanto, isso não pode ser avaliado. Além disso, o tratamento das culturas com a biomembrana onde o mastruz foi associado ao própolis, a ação antimicrobiana foi maior, indicando que

essa associação foi capaz de potencializar os efeitos do extrato de própolis (EPP-AF®), tal fato pode estar relacionado com o efeito imunomodulador do extrato de mastruz (NASCIMENTO et al, 2006) e do EPP-AF® (SILVEIRA et al, 2022), que podem estar atuando em sinergia.

Os resultados relacionados à atividade antibacteriana demonstraram, que as membranas de biocelulose incorporadas com a própolis apresentaram atividade bactericida frente a *S.aureus* e ausência dessa atividade diante de *E.coli*. Tal fato pode estar relacionado a entrada do bioativo na parede celular bacteriana, uma vez que, as bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular mais complexa quando comparadas ao grupo das Gram-positivas (CAMPOS, 2019). Outra possibilidade está relacionada a biodisponibilidade do extrato, ao contrário, do que ocorre no encapsulamento, as biomembranas permitem maior difusão dos princípios ativos no meio, como ocorre com os dados obtidos por Marquele-Oliveira et al, (2019) que mostraram que a ação antimicrobiana da própolis (EPP-AF®) se mantém em até sete dias, em um sistema de entrega sustentada baseado na incorporação da formulação auto-microemulsificante (SMEF), co-encapsulante de própolis (EPP-AF®) e do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* carregados em membranas de biocelulose incorporadas com a própolis. Essa manutenção da ação antimicrobiana do (EPP-AF®) foi determinada com base na aplicação de modelos matemáticos desenvolvidos para descrever a liberação de fármacos das formas farmacêuticas que a contêm. De acordo com o perfil cinético e de liberação, da biomembrana de celulose incorporada com o (EPP-AF®) observou-se uma liberação inicial rápida, provavelmente devido à adsorção do SMEF na superfície da membrana, e a partir de aproximadamente 48 h torna-se mais lento, mas não se decompõe, permanece e pode fornecer substâncias ativas por mais alguns dias, com isso, esta liberação sustentada poderia sugerir a possibilidade de trocas de curativos semanais sem que a eficácia fosse perdida.

Corroboram parcialmente com nossa proposição os dados obtidos por Marquele-Oliveira et al (2019), através de membranas de biocelulose incorporada com própolis (EPP-AF®) com atividade antibacteriana *in vitro*. Além disso, dentre os seus resultados foi possível demonstrar eficácia no tratamento de feridas cutâneas em ratos, com rápida reepitelização e organização tecidual,

no entanto, este resultado não pode ser verificado no presente trabalho, uma vez que, testes *in vivo* não foram realizados.

Os resultados quanto a ação antimicrobiana da própolis de *Apis mellifera* também foram descritos por Almuhayawi, (2020) e relacionados a presença de compostos como Kaempferol e a Quercetina, que também estão associados à atividade anti-inflamatória.

Dentre todos os tipos conhecidos, a própolis verde brasileira é um dos mais comercializados e estudados do mundo. Possui como principais componentes compostos fenólicos, como ácido p-cumárico, ácido fenílico, ácido cafeico, kaempferol, quercetina e o Artepillin C, sendo este último considerado como marcador de própolis verde (SANTOS et al, 2019).

Os três principais bioativos encontrados no EPP-AF® são o artepelin C, o ácido 4,5 dicafeoilquínico e a drupanina (SILVA,2022). Essa combinação de características (padronização, reprodutibilidade, atividades biológicas comprovadas e segurança) permite que o EPP-AF® seja considerado para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (BARUD et al., 2013; BERRETTA et al., 2012, 2013; DINIZ et al., 2020; HORI et al., 2013; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2019; SILVEIRA et al., 2021).

O extrato de mastruz, por sua vez, possui 4 estruturas moleculares de kaempferol e 3 de quercetina (RODRIGUES et al,201), enquanto que, o extrato da própolis possui apenas 1 estrutura de cada molécula, o que pode ter relação com a potencialização do efeito da própolis. Rios et al, (2017) mostrou que o extrato de *C.ambrosioides* na sepse polimicrobiana induzida melhora a atividade fagocítica e diminui o crescimento bacteriano, e conseqüentemente a resposta inflamatória sistêmica, o que pode explicar o potencial efeito de inibição do crescimento bacteriano observado nos testes antibacterianos do presente trabalho.

Os ensaios de MTT realizados utilizaram apenas os extratos de mastruz, própolis e as suas associações, ou seja, não foi possível considerar esse ensaio com os extratos incorporados nas biomembranas, pois para análises desse tipo é necessário um modelo 3D. Desse modo, durante a execução do protocolo experimental houve testes preliminares em formato 3D, mas apesar disso, no tempo oportuno esses testes foram inviáveis para compor a tese, visto que, a padronização desse modelo não pode ser estabelecida.

No teste por MTT realizado, pode-se observar que os extratos não apresentam citotoxicidade as células e isso, indica o percentual de viabilidade celular maior que 90%, ou seja, não citotóxica para os extratos de mastruz, própolis e o extratos de mastruz associado a própolis, o que corrobora com a escala de citotoxicidade de Dahl, Frangols Polyzois- Polyzois (2006) que permite classificar o percentual de viabilidade celular em: Maiores que 90% (não citotóxica); 60% - 90% (levemente citotóxica); 30% - 59% (moderadamente); Abaixo de 30% (severamente citotóxica).

Pinheiro- Neto et al (2017) elaboraram um biomaterial de mastruz a 5% com efeito cicatrizante aplicado de formação tópica em fratura óssea de coelho. No contexto, dos ensaios de cicatrização as biomembranas de celulose bacteriana foram incorporadas com o extrato de mastruz a 5%, o que corrobora parcialmente com o autor, visto que, os testes realizados foram *in vitro*.

Em relação aos testes *in vitro* de cicatrização não foi possível observar o fechamento da “ferida”, tal fato pode estar relacionado com uma série de fatores, uma vez que, o processo de cicatrização no organismo vivo e o processo de cicatrização *in vitro*, a análise não pode ser comparada. Visto que, os eventos de epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e a deposição de colágeno caracterizam a fase proliferativa (GREAVES et al., 2013). Os fibroblastos sofrerão migração para o local da lesão devido a ação de fatores de crescimento, principalmente o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos-2 (FGF-2) e Fator de Crescimento Transformante-beta (TGF- β) (RAHMAN, 2016).

No ensaio “*scratch assay*” realizado não foi utilizado nenhum tipo de marcador de proliferação celular e, os fibroblastos foram cultivados e expostos aos biocurativos. Desta forma, o presente trabalho está em desacordo com os resultados obtidos por Ribeiro Filho (2019), nos experimentos, nesse mesmo modelo de ensaio, fez uso de marcadores de proliferação, e com isso, pode observar o fechamento da “ferida”. Desta forma, a estimulação pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de FGF integram processos essenciais para a ocorrência da proliferação celular em conjunto com a angiogênese (HO et al., 2017).

A avaliação da cicatrização *in vitro* baseia-se na criação de uma lacuna em uma monocamada de células confluentes, com o intuito de observar se as

bordas do campo artificial criado vão formar novos contatos célula-célula, no sentido de seu fechamento (CAPPIELLO; CASCIARO; MANGONI, 2018). Os fibroblastos são as células predominantemente encontradas no tecido conjuntivo frouxo (KATCHBURIAN; ARANA, 2004) e são importantes nas fases de reparação e remodelação tecidual (PAN et al., 2006). Estas células são importantes para a produção dos componentes da matriz extracelular (BAXTER et al., 2002).

Por esse motivo, a compreensão da cicatrização *in vitro* por meio dos fibroblastos são relevantes, uma vez que, estas linhagens celulares migram para as áreas afetadas durante o processo de recuperação de lesões, auxiliando na produção de matriz celular e cicatrização.

De acordo com Liang et al (2007), no ensaio de migração celular, também chamado *scratch assay*, a ferida cicatriza de forma padronizada, onde as células migram em direção à fenda produzida -com o objetivo de fechar a lesão que é evento um característico da fase proliferativa do processo cicatricial, marcado pela migração de queratinócitos e fibroblastos. Além disso, o método apresenta diversas vantagens, como a observação do movimento e da morfologia celular em tempo real, a medição da velocidade de migração, além de ser um teste simples, de rápida configuração, fácil análise e baixo custo (ALMEIDA et al, 2019; URCIUOLO et al, 2022).

Sendo assim, não foi possível observar a migração de fibroblastos no período de 24 horas com o propósito de promover o preenchimento do espaço feito pelo risco simulando a ferida, mas apesar disso, pode-se observar macroscopicamente que a biomembrana de celulose incorporada com o extrato de mastruz, bem como a biomembrana de celulose incorporada com o extrato de própolis apresentaram atividade de proliferação celular, tal resultado demonstra que o bioproduto desenvolvido apresenta compatibilidade biológica.

Os efeitos biológicos das biomembranas podem ser potencializados, em virtude de suas propriedades provenientes da celulose bacteriana junto aos bioativos presentes nos extratos de *C. ambrosioides* (mastruz) e no extrato de própolis . Visto que, a celulose bacteriana possui capacidade de regeneração tecidual, assim como, o extrato de mastruz é conhecido por sua capacidade cicatrizante (PINHEIRO NETO et al, 2017) e a própolis referenciada pela sua atividade antibacteriana (BARUD et al, 2013), o que torna esse bioproduto

promissor em aplicações biomédicas, especialmente, como curativo em caso de feridas de difícil cicatrização. O PEG 400 foi utilizado como veículo nas formulações, devido suas características de absorção e ação antialérgica que somado ao caráter das nanofibras de celulose formam juntos, um biomaterial ideal para a incorporação dos extratos.

De acordo, com Barud (2016), o interesse no desenvolvimento de novos biomateriais biodegradáveis e biocompatíveis tem aumentado na engenharia de tecidos, especialmente pela necessidade de melhorar o processo de restauração de tecidos danificados ou doentes, bem como suas funções, sempre com o objetivo de aumentar a qualidade de vida das pessoas.

Nesse contexto, as biomembranas apresentam-se como potenciais biocurativos frente a problemática das feridas, pois a celulose bacteriana possui uma alta capacidade de regeneração tecidual por conta das suas nanofibras que em conjunto as propriedades de imunomodulação, ação cicatrizante e antimicrobiana dos bioativos presentes nos extratos de mastruz e própolis, tornam-se ainda mais promissoras quanto ao seu uso. Considerando as cinco propriedades que um biomaterial deve ter (LIMA, 2006), o biocurativo obtido nesta tese possui biocompatibilidade, biofuncionalidade, resistência a corrosão e é esterilizável, de acordo com os resultados *in vitro* e análises macroscópicas realizadas.

Sendo assim, os resultados apresentados são preliminares quanto ao efeito cicatrizante e antibacteriano de biomembranas de celulose incorporadas com extratos de mastruz e própolis, e que constituem potenciais perspectivas de tratamento diante à problemática de feridas crônicas, especialmente, aos diabéticos do tipo II.

Portanto, espera-se que o produto desta tese possa contribuir de forma direta ou indireta com a qualidade de vida das pessoas, principalmente, com aquelas que possuem feridas crônicas, como por exemplo, decorrente da problemática do pé diabético em portadores de diabetes mellitus tipo II, que por muitas vezes têm suas vidas interrompidas por conta das complicações da doença.

6. CONCLUSÕES

A análise química por FTIR registrou os principais grupos funcionais que permitem identificar os biopolímeros que constituem as biomembranas como biocurativos; A análise térmica por TG permitiu confirmar as propriedades térmicas das biomembranas como biocurativos; É possível incorporar o extrato hidroalcolóico de mastruz, o extrato etanólico de própolis, como também as suas associações em matrizes poliméricas para obtenção de biomembranas.

Os extratos de mastruz, própolis EPP-AF® e suas associações não apresentaram toxicidade celular;

A biomembrana de celulose incorporada com o extrato de própolis apresentou atividade antibacteriana frente ao *S.aureus*; A biomembrana de celulose incorporada com o extrato de mastruz e própolis EPP-AF® apresentou atividade antibacteriana frente ao *S.aureus*; A biomembrana incorporada apenas com o extrato de mastruz não apresentou atividade antibacteriana.

A biomembrana incorporada com o extrato de mastruz apresentou melhor atividade de aumento da proliferação celular, quando comparada a biomembrana incorporada com o extrato de própolis EPP-AF®; Os fibroblastos promoveram adesão à biomembrana de celulose bacteriana de modo mais significativo com extrato de mastruz, do que quando comparado as biomembranas de celulose incorporadas com o extrato de própolis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBADE, L. P.; S, L. Venous ulcer: epidemiology, physiopathology. Diagnosis and Treatment **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 6, 2011.

ABOL-FOTOUH, D., HASSAN, M.A., SHOKRY, H; ROIG A., AZAB M.S., KASHYOUT A. E-H. Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1. **Science Reports** v.10, p. 3491, 2020.

ALMUHAYAWI, M. S. Propolis as a novel antibacterial agent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 11, p. 3079–3086, 2020.

ALVES LR. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. Niterói-RJ: **Revista Virtual Química**, v.5, n.3, p.450-451. 2013.

AMON, R.L.R; SILVA, A.W; NOBRE. B.A; ALMEIDA, B; NOBRE, E.J.Q; PADILHA, M.P; SIQUEIRA, T.C; SOUZA, C.B.Análise de meios alternativos para a substituição de modelos animais nas pesquisas. **Revista Unilus Ensino e Pesquisa** v.18.n.52, 2021.

BADKE, M.R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**. v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.

BANKOVA, V.; MARCUCCIB M.C.; SIMOVA S, NIKOLOVA N, KUJUMGIEVC A, POPOV S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**. V.51, p.277–280,1996.

BARBOSA, G.P., DEBONE, H.S., SEVERINO, P., SOUTO, E.B., DA SILVA, C.F. Design and characterization of chitosan/zeolite composite films — Effect of zeolite type and zeolite dose on the film properties. **Materials Science and Engineering**, v.60, p.246-254, 2016.

BARROTE, E.B; VASCONCELLOS, E.P.G. Barreiras e facilitadores à adoção de tecnologias laboratoriais que substituem animais em pesquisa. **EMGEMA XXIII**, ISSN: 2359-1048 Novembro 2021.

BARUD, H. D. S. et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013,2013.

BARUD, H. G.; SILVA, R. R.; BARUD, H. S.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; OLIVEIRA, O. B. JR.; RIBEIRO, S. J. L. A. Multipurpose Natural and Renewable Polymer in Medical Applications: Bacterial Cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.

BARUD, H. S. et al. Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. **Journal of nanomaterials**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

BASMAJI, P.; DAMIANO, O.; CARLOS, S. Nanoskin® for medical applications innovative technology-innovatecs synthesis of bacterial cellulose scanning electronic microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) Nanoskin® in the treatment of chronic wounds and burns. *NSTI-Nanotech*, v. 3, p. 193–6, 2011.

BERMAN, B.; MADERAL, A.; RAPHAEL, B. Keloids and hypertrophic scars: Pathophysiology, classification, and treatment. **Dermatologic Surgery**, v. 43 Suppl 1, p. S3–S18, 2017.

BERRETTA, A. A. et al. Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p.64180, 2013.

BERRETTA, A. A. et al. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 512–521, 2012.

BOWDEN, L. G. et al. A morphoelastic model for dermal wound closure. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**, v. 15, n. 3, p. 663–681, 2016.

BRAGA, T.S.F.. Extrato Padronizado de Própolis (EPP – AF) aumenta a sobrevida em camundongos imunossuprimidos com sepse induzida por *Candida albicans*. [Tese]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2017. Doutorado em Ciências da Saúde, 2017.

BRASIL -Ministério da Saúde. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 14 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS – Relação nominal de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. 2009. Disponível em <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2020.

BURNOUF, T. et al. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. **Blood Reviews**, v. 27, n. 2, p. 77–89, 2013.

CALADO, G. P. et al. *Chenopodium ambrosioides* L. reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0141886, 2015.

CAMPELO, A.P.B.S; HOLANDA, E.U; CAMPELO, M.W.S..MEDICINA LONGE DOS HOLOFOTES, PERTO DAS PESSOAS. Capítulo 14: membranas bioativas utilizadas em associação à substâncias e biomateriais sintéticos e naturais, Ed. Athena, 2021.

CAMPOS, T. M. C. Avaliação de atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos extratos alcoólico e aquoso da própolis de *Scaptotrigona affinis postica*. Tese de Mestrado. São Paulo: Instituto Butantan; p. 111, 2019

CASTALDO. S, CAPASSO.F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.1–6, 2002.

CHANTRE, C.O., HOERSTRUP, S.P., PARKER, K.K.Engineering Biomimetic and Instructive Materials for Wound Healing and Regeneration. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, v.10, p. 97-106,2019.

COGER V, MILLION N, REHBOCK C, SURES B, NACHEV M, BARCIKOWSKI S, WISTUBA N, STRAUß S, VOGT PM. Tissue Concentrations of Zinc, Iron, Copper, and Magnesium During the Phases of Full Thickness Wound Healing in a Rodent Model. **Biological trace element research**. v.191, n. 1, p. 167-176, 2019.

COSTA, M.V.L.; TAVARES, E.S. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) – erva-de-Santa-Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, p.63-71,v.8, n.3, 2006.

CRUZ G.V.B.; PEREIRA P.V.S.; PATRÍCIO F.J.; COSTA G.C.; SOUSA S.M.; FRAZÃO J.B.; ARAGÃO FILHO W.C.; MACIEL M.C.G.; SILVA L.A.; AMARAL F.M.M.; BARROQUEIRO E.S.B.; GUERRAR.N. M.; NASCIMENTO F.R.F. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 111, 148-154, 2007.

CYSNE, D. N. et al. Antimalarial potential of leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. **Parasitology research**, p. 4327–4334, v. 115, n. 11, 2016.

DE ANDRADE, Cristiana Oliveira Batista. A EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAL FRENTE ÀS POSSIBILIDADES DE UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS: uma questão ética e jurídica. **Anais dos Congressos Estaduais de Magistrados-RS**, v. 2, n. 2, 2021.

DINIZ, F.R., MAIA, R.C.A.P., RANNIER, L., ANDRADE, L.N., CHAUD, M.V., DA SILVA, C.F., CORRÊA, C.B., DE ALBUQUERQUE JUNIOR, R.L.C., DA COSTA, L.P., SOUTO, E.B., SEVERINO, P. Silver nanoparticles-composing alginate/gelatin hydrogel improves wound healing in vivo. **Nanomaterials** v.10, p.390, 2020.

DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care. **Materials Science & Engineering. C, Materials for biological applications**, v. 48, p. 651–662, 2015.

FERREIRA, P. I., GOMES, J. P., STEDILLE, L. I., DA COSTA BORTOLUZZI, R. L., MANTOVANI, A. Potencial terapêutico de espécies arbóreas em fragmentos de Floresta Ombrófila Mista. **Floresta e Ambiente**, v.23, n.1, p.21-32, 2016.

FRADE, M. A. C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 1, p. 45–51, 2012.

FRANÇA, F., LAGO, E. L., MARSDEN, P. D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, p. 447-453, 1996.

GADELHA, C.S.; PINTO JUNIOR, V.M.; BEZERRA, K.K.S.; MARACAJÁ, P.B.; MARTINS, D.S.S. Utilização de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais em diferentes segmentos da sociedade. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, n.3, p.1-15, 2015.

GONZÁLEZ-MASÍS, J.; CUBERO-SESIN, J. M.; CORRALES-UREÑA, Y. R.; GONZÁLEZ-CAMACHO, S.; MORA-UGALDE, N.; BAIZÁN-ROJAS, M.; LOAIZA, R.; VEGA-BAUDRIT, J. R.; GONZALEZPAZ, R. J. Increased Fibroblast Metabolic Activity of Collagen Scaffolds via the Addition of Propolis Nanoparticles. **Materials**, [S.L.], v. 13, n. 14, p. 3118, 2020.

GREAVES, N. S. et al. The role of skin substitutes in the management of chronic cutaneous wounds. **Wound Repair And Regeneration**, v. 21, n. 2, p.194-210, 2013.

GUPTA, B., RAMASAMY, T., POUDEL, B.K., PATHAK, S., REGMI, S., CHOI, J.Y., SON, Y., THAPA, R.K., JEONG, J.-H., KIM, J.R., CHOI, H.-G., YONG, C.S., KIM, J.O. Development of Bioactive PEGylated Nanostructured Platforms for Sequential Delivery of Doxorubicin and Imatinib to Overcome Drug Resistance in Metastatic Tumors. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.9, p.9280- 9290, 2017.

HELMUS, M.N., D.F. GIBBONS, AND D. CEBON, Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. **Toxicology Pathology**, v.36, n.1, p. 70-80, 2008.

HETTLER, A.; Werner, S.; EICK, S.; LAUFER, S.; WEISE, F. A new *in vitro* model to study cellular responses after thermomechanical damage in monolayer cultures. **PLoS ONE**, v.8, 2013.

KHAN, F.; TANAKA, M.; AHMAD. Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 42, 2015.

KIM, J.; LEE, C.-M. Wound healing potential of a polyvinyl alcohol-blended pectin hydrogel containing Hippophae rhamnoides L. extract in a rat model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 586–593, 2017.

KISMANN, K. G. Plantas infestantes e nocivas. São Paulo: BASF Brasileira, 1991.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIMA, P.M., Informativo da área de ciência e engenharia dos biomateriais., in Tópicos em biomateriais. 2006.

MACHADO, J. L., ASSUNÇÃO, A. K., DA SILVA, M. C., DOS REIS, A. S., COSTA, G. C., ARRUDA, D.S. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

MACHADO, R.T.A. et al. Preparação e caracterização de membranas de biocelulose obtidas pela biossíntese da bactéria *Komagataeibacter rhaeticus*. **Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros** – Natal, RN – 18 a 22 de outubro de 2015.

MACHÍN, L. et al. Bixa orellana L. (Bixaceae) and *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae) Essential Oils Formulated in Nanocochleates against *Leishmania amazonensis*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 23, p. 4222, 2019.

MARINS, A. K.; VIEIRA, D. F.; QUADROS, I. P. S.; PINHEIRO, P. F.; QUEIROZ, V. T.; COSTA, A. V. Prospecção fitoquímica das partes aéreas da Erva-de-Santa-Maria (*Chenopodium ambrosioides* L.). In: **Encontro Latino**

Americano de Iniciação Científica e Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, Alegre, Espírito Santo, v. 15, pp.1-5, 2011.

MARQUELE-OLIVEIRA, Franciane et al. Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. **International journal of biological macromolecules**, v. 136, p. 570-578, 2019.

MARTINOTTI S, PELLAVIO G, LAFORENZA U, RANZATO E. Propolis induces aqp3 expression: A possible way of action in wound healing. **Molecules**, v.24, n.8, p.1544, 2019.

MOGOȘANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 2, p. 127–136, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUALLA, S. A. et al. Study of nanoskin ECM-bacterial cellulose wound healing/United Arab Emirates. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 07, n. 02, p. 109–117, 2016.

NASCIMENTO, FRF, RIBEIRO-DIAS F, RUSSO M. Cytotoxic activity of BCG-activated macrophages against L929 tumor cells is nitric oxide-dependent. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p. 1593–1596, 1998.

NASCIMENTO FRF, CALICH VL, RODRIGUEZ D, RUSSO M. Dual role for nitric oxide in paracoccidioidomycosis: essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **The Journal of Immunology**, v.168, p.4593–4600, 2002.

NASCIMENTO FRF, CRUZ GVB, PEREIRA PVS, MACIEL MCG, SILVA LA, AZEVEDO APS, BARROQUEIRO ESB, GUERRA RNM. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v.78, n.22, p. 2650 – 2653, 2006.

NASCIMENTO, K.A.F. *Chenopodium ambrosioides* L.: do uso popular ao bioproduto com atividade cicatrizante. [Tese]. São Luís: Universidade Federal do Maranhão; 2013. Doutorado em Biotecnologia.

NAYAK, S. B. et al. Wound-Healing Potential of Oil of *Hypericum perforatum* in Excision Wounds of Male Sprague Dawley Rats. **Advances In Wound Care**, p.401-406, v. 6, n. 12, 2017.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEIVA, V.A., RIBEIRO, M.N.S., NASCIMENTO, F.R.F., CARTAGENES, M.S.S., COUTINHOMORAES, D.F., AMARAL, F.M.M. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.24, n.2, p. 215–224, 2014.

OLCZYK, P.; KOMOSINSKA-VASSEV, K.; KRZYMINIEWSKI, R.; KASPERCZYK, J.; RAMOS, P.; DOBOSZ, B.; BATORZYNA, O.; STOJKO, J.; STOJKO, M.; IVANOVA, D. The Estimation of Blood Paramagnetic Center Changes during Burns Management with Biodegradable Propolis-Nanofiber Dressing. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1-9, 2020.

PATEL, N.R. AND P.P. GOHIL, A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. **International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering**, 2012. 2(4)

PATRÍCIO, F., COSTA, G. C., PEREIRA, P. V. S., ARAGÃO-FILHO, W. C., SOUSA, S. M., FRAZÃO, J. B., PEREIRA, W. S., MACIEL, M. C. G., SILVA, L. A., AMARAL, F. M. M., REBELO, J. M. M., GUERRA, R. N. M., RIBEIRO, M. N. S., NASCIMENTO, F. R.F., Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.313–319, 2008.

Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus
Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sctie/daf/pnmpf/ppnmpf/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-2013-renisus>> Acesso em: 18 nov.2021.

PENHA ES, LACERDA SR, CARVALHO MGF, OLIVEIRA PT. Effect of *Chenopodium ambrosioides* on the healing process of the in vivo bone tissue. **Microscopy Research and Technique**.

PENHA, E. S. DA et al. Effect of *Chenopodium ambrosioides* on the healing process of the in vivo bone tissue. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, n. 11, p. 1167–1173, 2017.

PEREIRA, W. S. et al. Anti-arthritic properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 8, p. 1078–1091, 2018.

PICOLOTTO, A. et al. Bacterial cellulose membrane associated with red propolis as phytomodulator: Improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. *Biomedecine & pharmacotherapie [Biomedicine & pharmacotherapy]*, p. 108640, v. 112, n. 108640, 2019.

PINHEIRO NETO, V.F; RIBEIRO, R.M; MORAIS, C.S; CAMPOS, M.B; VIEIRA, D.A; GUERRA, P.C; ABREU-SILVA, A.L; SILVA JUNIOR, J.R; NASCIMENTO F.R.F; BORGES, M.O.R; BORGES, A.C.R; *Chenopodium ambrosioides* as a bone graft substitute^[1] ^[U2] in rabbits radius fracture. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

PIRES ALR, Bierhalz AC, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quím Nova*. 2015;38(7):957-71.

PLIKUS, M. V. et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. **Cell**, v. 184, n. 15, p. 3852–3872, 2021.

RAGHAV, A; KHAN, Z. A; LABALA, R. K; AHMAD, J; NOOR, S; MISHRA, B. K. Financial burden of diabetic foot ulcers to world: a progressive topic to discuss always. **Therapeutic advances in endocrinology and metabolism**, v.9,n.1,p. 29–31, 2018.

RAHMAN, H. N. A. et al. Selective Targeting of a Novel Epsin–VEGFR2 Interaction Promotes VEGF-Mediated Angiogenesis is Novelty and Significance. *Circulation Research*, v. 118, n. 6, p.957-969, 2016.

RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M.; KUMBHAR, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, n. 6, p. 2491–2511, 2015.

RAMASAMY, T., MUNUSAMY, S., RUTTALA, H.B., KIM, J.O. Smart Nanocarriers for the Delivery of Nucleic Acid-Based Therapeutics: A Comprehensive Review. **Biotechnology Journal** , 2020.

RAMASAMY, T., RUTTALA, H.B., GUPTA, B., POUDEL, B.K., CHOI, H.G.,

YONG, C.S., KIM, J.O. Smart chemistry-based nanosized drug delivery systems for systemic applications: A comprehensive review. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 258, p. 226-253, 2017.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*; eds; Elsevier: Oxford, 2013, cap. History of Biomaterials.

RATNER, B.D., et al., *Biomaterials Science A Multidisciplinary Endeavor*, in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. **Elsevier Science**, 2004.

RAYMENT, E. A.; UPTON, Z. Review: Finding the Culprit. **The International Journal Of Lower Extremity Wounds**, v. 8, n. 1, p.19-27, 2009.

REBOUÇAS SILVA, J; CELES, F.S; LIMA, J.B; BARUD, H.S; DE OLIVEIRA, C.I; BERRETTA, A.A; BORGES, V.M. Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by Standardized Propolis Extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

RÉGIS, M.A; ROSENDO, R.A; MEDEIROS, L.A.D.M; FOOK, M.V.L; BARBOSA R.C; FIGUEIREDO, A.B.M; MORAES, W.G.A; SIQUEIRA, R.R; BRASIL, A.W.L. Desenvolvimento e caracterização de esferas de quitosana/ Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants. **Revista Matéria**, v.25,n.4, 2020.

REIS, A. S. et al. ATIVIDADE LEISHMANICIDA in vitro DE FRAÇÕES DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Ciências da Saúde**, v. 14, p. 119–126, 2012.

REIS, A. S. et al. Atividade leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Ciências da Saúde**, v. 14, p. 119–126, 2012.

RENAMA. <Disponível em: <http://renama.tec.br/quem-somos/>> Acesso em: 04 ago. 2022.

RIOS, C. E. P. et al. *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–7, 2017.

ROCHA, P.S; FEDER, D; GREGÓRIO, L.E; MOREIRA, J.N; SAMPAIO, L.R.L; FONSECA, F.L.A; VEIGA, G.L; SCORZA, F.A; SCORZA, C.A; PERAZZO, F.F; Clinical Assessment of Antimicrobial Effects of Brazilian Green Propolis on Chronic Wounds. **Pharmacological Research**, v.14, n.3, p.251-5, 2022.

RODRIGUES, J. G. M. et al. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. **Journal of ethnopharmacology**, v. 264, n. 113287, p. 113287, 2021.

SAAVEDRA, P. A., DEBRITO, E. S., AREDA, C. A., ESCALDA, P. M., & GALATO, D. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. **International journal of burns and trauma**, v.9, n.5, p.88–9,2019.

SANTOS R. A. C. et al. Draft genome sequence of *Komagataeibacter rhaeticus* strain AF-1, a high producer of cellulose, isolated from *Kombucha tea*. **Genome Announcements**, v. 2, p. 1–2, 2014.

SBD - SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES.

Disponível Em: <<https://portaldeboaspraticas.iff.fiocruz.br/> Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019 – 2020> Acesso em: 02 ago. 2022.

SENNA, L. *Chenopodium* In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010.

SOUTO, E.B., SEVERINO, P., YASSUE-CORDEIRO, P.H., FELISBINO, R.F., GOMES, E.L., DA SILVA, C.F. Organic/Zeolites Nanocomposite Membranes, Organic-Inorganic Composite Polymer Electrolyte Membranes. **Springer**, p. 73-98, 2017.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **American Journal of Surgery**, v. 176, n. 2, p. 26S-38S, 1998.

TALKSCIENCE. Disponível em: <<https://www.talkscience.com.br/industria-cosmetica/quais-sao-as-alternativas-para-empresas-que-nao-fazem-testes-em-animais>> Acesso em 30 jul.2022.

TRACY, L.E.; MINASIAN, R.A.; CATERSON, E.J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Advanced Wound Care**, v. 5, p.119–136, 2016.

TRIVELLATOGRASSI L, MALHEIROS A, MEYRE-SILVA C, BUSS ZS, MONGUILHOTT ED, FRODE TS et al.. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.145, p.127-38, 2012.

URCIUOLO, F; PASSARIELLO, R; IMPARATO, G; CASALE, C; NETTI, P.A. Bioengineered Wound Healing Skin Models: The Role of Immune Response and Endogenous ECM to Fully Replicate the Dynamic of Scar Tissue Formation In Vitro. **Bioengineering (Basel)**, v.9, n.6, p.233, 2022.

Veiga GL, Scorza FA, Scorza CA, Perazzo FF. Clinical Assessment of Antimicrobial Effects of Brazilian Green Propolis on Chronic Wounds. **Pharmacological Research**, v.14, n.3, p.251-5, 2022.

WANG, P. H. et al. **Wound healing. Journal of The Chinese Medical Association**, v. 81, n. 2, p.94-101, 2018.

WHITE-CHU, E. F.; CONNER-KERR, T. A. Overview of guidelines for the prevention and treatment of venous leg ulcers: a US perspective. **Journal of Multidisciplinary Healthcare** , v. 7, p. 111–117, 2014.

WHO - World Health Organization. Antibiotic resistance. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antibiotic-resistance>. Published 2021>. Acesso em: 30 jul.2022.

YU T. et al. Topical insulin accelerates cutaneous wound healing in insulin-resistant diabetic rats. **American Journal of Translational Research**, v. 9, n.10, p. 4682- 4693, 2017.

ZOGAJ, X.;NIMTZ, M.; ROHDE, M; BOKRANZ, W.; ROMLING,U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second componente of the extracelular matrix. **Molecular Microbiology**, v.39, p.1452 – 1463, 2001.

APÊNDICE A

RELATO DE CASO

Midas Pet & Life: uma empresa de base científica

Marla Raquel Pontes da Rocha ¹; Emanuelle dos Santos Pinheiro ²

¹ Programa de Pós-graduação Rede Nordeste de Biotecnologia – UFMA; Sócia-fundadora Midas Pet & Life

² Centro Universitário Estácio São Luís; Sócia-fundadora Midas Pet & Life

RESUMO

A Midas Pet & Life é uma empresa de base científica voltada para o Mercado Pet Care que nasceu no ambiente universitário, com o desafio de transformar pesquisas com validação científica em bioprodutos. O mercado pet movimentava bilhões de dólares e o Brasil representa o maior mercado pet da América Latina (2018 com US\$ 20,7) e o 2º colocado no cenário mundial. A Midas Pet & Life é uma empresa idealizada nos moldes P&D a partir de eixos relacionados a sustentabilidade econômica, ambiental e social, por esse motivo entrega ao mercado pet produtos naturais, essencialmente, formulados por meio de matéria-prima da biodiversidade amazônica. Temos o propósito de levar saúde e bem-estar aos pets e seus tutores, pois entendemos que se o seu pet está bem, você também está. A partir disso, empregos e oportunidades de negócios serão promovidos, o que irão contribuir com a economia do estado do Maranhão, bem como da formação da cultura de um ecossistema de empreendedorismo inovador.

Palavras – Chave: empreendedorismo feminino; produtos naturais; mercado pet care; empresa de base científica

Idealização do negócio

A ideia surgiu no ano de 2019, quando fui realizar um estágio na cidade de Araraquara-SP. Lá ingressei no laboratório de um pesquisador parceiro no desenvolvimento da minha tese de doutorado, e em conjunto a isso participei de um evento sobre empreendedorismo na UNESP. Em conversas paralelas com os colegas que havia feito amizade, o Programa Centelha foi mencionado e a partir disso comecei a pesquisar a respeito dos Programas de Fomento. No meu retorno a São Luís iniciei a minha jornada de capacitação na área de bioempreendedorismo e no final de 2019 foi lançado a 1ª edição do Programa Centelha do Maranhão.

Iniciativas como a do Centelha, partem de algo maior, como o Novo Marco Legal de Ciência, Tecnologia e Inovação, aprovado em 2018 pelo Governo Federal. O referido marco está embasado na Lei nº 13.243/2016, que dispõe sobre estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação, e que altera a Lei nº 10.973/2004, denominada de “Lei da Inovação”. Esta ação representou um grande avanço legal e de mudança cultural sobre como a inovação deve ser alcançada.

A regulamentação da lei nº 13.243/2016 se dá a partir do Decreto nº 9.283/2018, que regulamenta o novo Marco Legal de Ciência, Tecnologia e Inovação, estabelece que os projetos de pesquisa, desenvolvimento e inovação poderão contemplar, entre outras finalidades:

- Execução de pesquisa científica básica, aplicada ou tecnológica.
- Desenvolvimento de novos produtos, serviços ou processos e aprimoramento dos já existentes. - Fabricação de protótipos para avaliação, teste ou demonstração.
- Capacitação, formação e aperfeiçoamento de recursos humanos para atuação em pesquisa, desenvolvimento e inovação, inclusive no âmbito de programas de pós-graduação.

Inspirado no referido marco, o governo do estado iniciou em 2020 importantes debates quanto ao projeto de lei do Marco Estadual de Ciência,

Tecnologia e Inovação do Maranhão, as principais universidades participaram desse momento. A UFMA, por exemplo, chegou a enviar sugestões ao projeto de lei¹. O referido marco objetiva fomentar o desenvolvimento científico, a pesquisa, a capacitação científica e tecnológica e a inovação promovendo educação e aproximando os diversos atores que constituem esse ecossistema, congregando instituições públicas e privadas. Com o Marco Legal, serão fortalecidos a cooperação entre estas instituições e o empreendedorismo de base científica e tecnológica, sendo o lançamento ocorrido dia cinco de julho de 2022.

É nesse contexto que iniciativas como o Programa Centelha surgem com o objetivo de gerar novas empresas de base tecnológica; inovações que sejam de interesses sociais e empresariais; e a formação da cultura do empreendedorismo inovador, a fim de fortalecer os ecossistemas de inovação do país, a primeira edição do programa foi lançada em 2019 no Maranhão. De acordo com informações presentes no edital Programa Centelha MA², ele foi uma realização do MCTI, por meio da FINEP, em parceria com as Fundações de Amparo à Pesquisa estaduais. No caso do Maranhão, a FAPEMA foi a executora e contou com a parceria de instituições locais.

O principal objetivo do edital foi estimular a criação de empreendimentos inovadores e disseminar a cultura empreendedora no Maranhão, no âmbito do programa “Inova Maranhão”³. O estímulo parte da transferência de recursos de subvenção econômica que são considerados não reembolsáveis. Espera-se, portanto, a geração de empresas de base tecnológicas a partir da transformação de ideias inovadoras em empreendimentos que incorporem novas tecnologias aos setores econômicos estratégicos do estado do Maranhão.

A subvenção econômica à inovação prevista no edital, apresentou um valor global de R\$ 1.480.000,00 (um milhão quatrocentos e oitenta mil reais),

¹ Disponível em <http://www.ufma.br/portalUFMA/arquivo/3sTxO3p9XLGBVva.pdf>

² Disponível em <https://programacentelha.com.br/wp-content/uploads/2020/01/V1-MA-Edital-Centelha.pdf>

³ O Inova Maranhão é um Programa do Governo do Estado veiculado à Secretaria da Ciência, Tecnologia e Inovação (SECTI) que tem como objetivo estimular junto à sociedade maranhense o desenvolvimento de ações voltadas para a inovação, empreendedorismo, desenvolvimento tecnológico, desenvolvimento sustentável e inovação social. O programa nasceu em 2015, inicialmente como um programa de incubação de Startup.

sendo R\$ 1.110.000,00 (um milhão cento e dez mil reais), oriundos do Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FNDCT/FINEP e R\$ 370.000,00 (trezentos e setenta mil reais) provenientes da Contrapartida do Estado do Maranhão. Segundo o Edital FAPEMA nº Edital nº 22/2019, os projetos submetidos passaram por três fases distintas e eliminatórias

- a) Fase 1 (Ideias Inovadoras): Nesta fase as principais dimensões a serem apresentadas pelos proponentes são: (a) problema que soluciona e a explicação da oportunidade, (b) características básicas da solução proposta, (c) diferencial inovador frente ao que já existe no mercado e (d) identificação e perfil da equipe envolvida. É quando os proponentes farão a inserção de informações básicas sobre a principal ideia da proposta; b)
- b) Fase 2 (Projeto de Empreendimento): Nesta fase as principais dimensões a serem apresentadas pelos proponentes são: (a) equipe, (b) produto, (c) tecnologia, (d) mercado, (e) capital e (f) gestão. É quando os proponentes farão os detalhamentos das propostas submetidas na fase anterior, agora com foco na viabilidade e no desenvolvimento do empreendimento. c)
- c) Fase 3 (Projeto de Fomento): Nesta fase, os proponentes devem detalhar o cronograma físico financeiro da proposta e aplicação dos recursos de subvenção a serem recebidos

Tabela 1. Projetos aprovados por temática

TEMÁTICA	QUANTIDADE	PERCENTUAL
Biotecnologia e Genética	07	25,00%
Tecnologia Social	06	21,40%
Inteligência Artificial e <i>Machine Learning</i>	05	17,81%
Automação	02	7,14%
Design	02	7,14%
Química e Novos Materiais	02	7,14%
Nanotecnologia	01	3,57%
Geoengenharia	01	3,57%
Realidade Virtual	01	3,57%
TI e Telecom	01	3,57%
Total	28	100%

Fonte: elaborado pela autora com base Diário Oficial ANO CXIV Nº 209 SÃO LUÍS, QUARTA-FEIRA, 11 DE NOVEMBRO DE 2020.

Importante destacar que a temática da Biotecnologia e Genética assume um papel de destaque no cenário maranhense, com 25% de projetos aprovados. Essa situação, reflete a preocupação dos empreendedores em melhorar a sustentabilidade e a eficiência nos processos de fabricação em áreas voltadas para o meio ambiente, alimentação, biocombustíveis, cosméticos e até mesmo para vacinas. Dentro do referido grupo, encontra-se a Midas Pet & Life que tem a missão de levar saúde e bem-estar aos pets e seus tutores, através de produtos formulados a partir de extratos vegetais cujas pesquisas já foram validadas no âmbito acadêmico, a exemplo do mastruz (*Chenopodium ambrosioides*).

A escolha do mercado pet se deu por estar em um processo de crescimento constante pois já representa 0,36% do PIB brasileiro, à frente dos setores de utilidades domésticas e automação industrial. Destaca-se ainda que o maior mercado ainda são os EUA, com 40,2% dos US\$ 124,6 bilhões totais. Atrás estão: Brasil (5,2%) e o Reino Unido (4,9%), completando assim os três maiores mercados Pet mundiais. Por outro lado, dado sobre a segmentação do mercado pet apontam que Pet Food, que representou 73,9% do faturamento, seguido por Pet Serv (17,7%) e Pet Care (8,4%) (ABINPET, 2018).

A Midas Pet & Life na primeira edição do Centelha-MA

O programa Centelha possui um prazo, normalmente, para sua execução de um ano. A ideia submetida e aprovada, pela Midas Pet & Life foi de uma pomada cicatrizante à base de mastruz para pets (cães e gatos). Durante a execução do programa a equipe, percebeu que lançar uma pomada com uma proposta terapêutica no prazo de um ano seria inviável. Essa situação é decorrente das legislações vigentes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pela regulação e normatização de serviços vinculados ao setor.

Dentro Centelha, as equipes participam de muitas mentorias que contemplam diversas temáticas, como precificação, Canvas de modelo de negócio, *branding*, viabilidade do negócio dentre outros. Ocorre que, em uma das mentorias, a equipe chegou à conclusão de que dentro do prazo de um ano e com recursos limitados, seria impossível lançar a pomada. Foi então, que

decidimos não lançar um produto terapêutico, mas sim, um produto voltado para higiene e beleza. A equipe lançou, a princípio, um sabonete pet feito com extrato de mastruz que promove um reestabelecimento da pelagem dos pets de forma saudável e natural.

A equipe, por sua vez, começou a produzir o extrato de mastruz em parceria com o Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Foram coletados 12kg de mastruz e produzidos 5L de extrato, aproximadamente. Com o extrato pronto, buscamos aprimorar o processo de incorporação em uma base vegetal, ainda de forma artesanal.

FIGURA 1- MVP do sabonete da Midas Pet & Life



Fonte: Rocha; Pinheiro, 2021

Na Figura 1 possui dois sabonetes, o verde feito somente de extrato de mastruz e o outro, na cor marrom incorporamos o extrato de própolis com o mastruz (Objeto da tese). Por uma questão de custo, a empresa optou por permanecer, inicialmente, com a versão feita somente de mastruz. Nessa versão MVP, a empresa não comercializou os sabonetes, apenas deu como presente. Os relatos após o uso, foram bastante animadores.

Ainda com o recurso do Centelha – MA, a empresa iniciou o processo de registro da marca, fez a compra de embalagens e moldes personalizados. Além disso, a empresa tem buscado através desse recurso, adquirir equipamentos voltados para o processo de produção de extratos vegetais e óleos essenciais. Essa iniciativa visa, fortalecer o eixo P&D da empresa e, futuramente,

desenvolvermos outros produtos voltados para o mercado pet a partir dos bioativos da Amazônia e Cerrado.

Figura 2: Sabonete (Pelonete) pronto para comercialização



Fonte: Rocha; Pinheiro, 2021

Atualmente, o sabonete está sendo manufaturado por uma farmácia de manipulação em São Luís. A sua comercialização é exclusividade da Midas Pet & Life e está sendo feita através de indicações. Estamos buscando desenhar os canais de venda em modelos B2C e B2B nos canais online e offline.

Com relação ao Centelha, o programa deveria ser encerrado agora no mês de junho de 2022, no entanto, foi prorrogado por mais cinco meses, devido aos atrasos no período da pandemia. A empresa já investiu a primeira e a segunda parcela do recurso e, agora aguarda o pagamento da terceira parcela.

Muitos são os programas voltados para Startups e empresas com a cultura da inovação. Por isso, a Midas Pet & Life ao longo do Centelha, participou de outros editais tais como a primeira edição do programa de Pré-Incubação do NAVE-UFMA, ficamos em primeiro lugar. Atualmente, a empresa está sendo

acelerada pelo programa Inova Amazônia (primeira edição), em parceria com a acelerado Ventur e Sebrae. Neste edital, a proposta submetida foi a do sabonete de mastruz associado com o óleo de babaçu. O programa terá a duração de seis meses, onde assim como no Centelha, recebemos diversas mentorias e recursos financeiros.

Desafios e Perspectivas

Nesse cenário, a proposta de negócio foi idealizada de forma estruturada para submissão ao Programa Centelha, e na época concorremos com a Midas Pet & Life – produtos para o mercado pet. Posteriormente, fomos ingressando em outros editais e se inserindo cada vez mais no ecossistema de empreendedorismo. De um modo geral, estes editais têm como princípio responder as seguintes perguntas, considerando o que o “Mercado quer”, ou seja, qual é o problema? qual é a dor? que as pessoas comprem a solução? Então, assim nasceu a ideia de adentrar o mercado pet, no decorrer do Programa foram muitos os desafios, sendo o primeiro deles a mudança do nosso produto de lançamento que antes era uma pomada de mastruz cicatrizante e depois pivotamos para o sabonete capaz de promover o crescimento dos pelos.

O segundo problema foi o espaço, porque precisamos de um laboratório para desenvolver os nossos produtos, e infelizmente, esses programas não contemplam esse tipo de benefício e para as Startups de Biotecnologia que precisam de Laboratório, dependem de Acordos de Cooperação entre as Instituições de Ensino Superior e a Startup, que no nosso caso não foi possível de estabelecer. O terceiro problema está relacionado ao atraso do pagamento do recurso, pois já não éramos somente uma “ideia” e sim, pessoa jurídica e todo mês com custos fixos para poder continuar operando. O recurso obtido não contemplava esses custos, porém, para poder receber o recurso precisávamos ter empresa constituída.

Destarte, esses foram os três principais desafios enfrentados com base na 1ª edição do Programa Centelha do Maranhão. Atualmente, estamos inseridas no ecossistema do empreendedorismo através de outros editais de fomento, como por exemplo o Inova Amazônia e Startup Nordeste, paralelo a

isso participamos de eventos relacionados a Empreendedorismo e Inovação na Black Swan, Estácio, Uninassau e dentre outros.

Diante disso, como perspectivas da Midas Pet & Life temos a aquisição de equipamentos, crescimento de receita e lançamento de novos bioprodutos, como também iniciar o processo de internacionalização da empresa.

APÊNDICE B: Pedido de Depósito de Patente no INPI

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2020 002643 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 06279103000119**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.**Cidade:** São Luis**Estado:** MA**CEP:** 65080-805**País:** Brasil**Telefone:** (98) 32728710**Fax:****Email:** nit-dapi@ufma.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

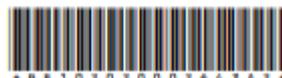
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Biomembrana a base de extrato de mastruz e seu uso

Resumo: A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um biomaterial formado por polímeros naturais ou sintéticos, tendo como base as formulações do extrato vegetal de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L, sinônimo *Dysphania ambrosioides* L). Desse modo, as aplicações podem ser de forma isolada, como também, em associação com outros extratos orgânicos, preferencialmente, ao extrato de própolis. Para tanto, suas formas farmacêuticas têm como finalidade a profilaxia e a terapêutica nos processos inflamatórios, de cicatrização tecidual, seja em casos sem infecção e com infecção. Sendo assim, sua aplicação destina-se para o uso humano e veterinário.

Figura a publicar: 5

APÊNDICE C: Publicação de Patente no INPI

República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020002643-7 A2**(22) Data do Depósito: 07/02/2020****(43) Data da Publicação Nacional: 17/08/2021**

(54) Título: BIOMEMBRANA A BASE DE EXTRATO DE MASTRUZ E SEU USO

(51) Int. Cl.: A61L 26/00.

(52) CPC: A61L 26/0057; A61L 26/009.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO.

(72) Inventor(es): FLÁVIA RAQUEL FERNANDES DO NASCIMENTO; MARLA RAQUEL PONTES DA ROCHA.

(57) Resumo: BIOMEMBRANA A BASE DE EXTRATO DE MASTRUZ E SEU USO. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um biomaterial formado por polímeros naturais ou sintéticos, tendo como base as formulações do extrato vegetal de mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L, sinônimo *Dysphania ambrosioides* L). Desse modo, as aplicações podem ser de forma isolada, como também, em associação com outros extratos orgânicos, preferencialmente, ao extrato de própolis. Para tanto, suas formas farmacêuticas têm como finalidade a profilaxia e a terapêutica nos processos inflamatórios, de cicatrização tecidual, seja em casos sem infecção e com infecção. Sendo assim, sua aplicação destina-se para o uso humano e veterinário.

ANEXO A: Identificação botânica da espécie vegetal

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
 Fundação instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luís - Maranhão.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS
HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR

São Luís, 10 de Julho de 2017.

CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO

Segue abaixo a confirmação da identificação realizada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará, em breve, devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.

Nº tombo MAR	Coletor (número)	Família	Espécie
9.349	GOMES, L. N. e E.B. Almeida Jr. (01)	Amaranthaceae	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants

Atenciosamente,


 Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.
 Curador do Herbário MAR

ANEXO B: Tabela da caracterização química do mastruz

Tabela 1: Caracterização química do extrato hidroalcolólico de *C. ambrosioides* de acordo com o método HPLC-ESI-IT/MS and FIA-ESI-IT/MSn

Number	[M-H] ^a	MS ^{ab}	Compound
1	191	173;127;85	Quinic acid
2	193	135	Glucuronic acid
3	295	163	Coumaroyl-xilose acid
4	739	593;285	Kaempferol-3-glucoside-2"- rhamnoside-7- rhamnoside-7
5	725	285	Kaempferol-0-pentoside-2"- rhamnoside-hexoside
6	431	285	Kaempferol-3-0-alpha-1- rhamnoside
7	593	285	Kaempferol-3-glucoside-3"- rhamnoside
8	563	431;285;151	Kaempferol-0- rhamnoside-pentoside
9	595	301;151	Quercetin-3-0-arabinoglucoside
10	579	447;301	Quercetin-0- rhamnoside-pentoside
11	579	447;301	Naringin
12	609	463;301	Quercetin-3-0- rutinoside
13	463	301	Quercetin-3-O-glucoside
14	623	447;301	Isorhammetin-3-O-rutinoside
15	301	285;267;241;173	Hesperetin
16	285	257	Kaempferol

^a Desprotonation; ^b Multiple-Stage-Fragmentations

Fonte: Rodrigues et al, 2021

ANEXO C: HPLC/DAD: quantificação de substâncias bioativas do extrato de própolis (n=3 ± SD).

Biomarcador da Própolis	Concentração ± SD (mg/g)
Ácido cafeico	0,685±0,028
Ácido p-cumárico	3,786±0,027
3,5 Dicafeoilquinico	4,163±0,006
4,5 Dicafeoilquinico	7,039±0,074
Aromadendrina	1,422±0,016
Drupanina	5,460±0,123
Crise	0,825±0,025
Galangina	2,797±0,188
Artepilin C	13,149±1,647
Bacarina	1,422±0,264
Total de Bioativos	40,747±2,4

Fonte: Silva, 2022

ANEXO D: Declaração de contemplação em edital para empreendimentos inovadores

FAPEMA - Declaração de pesquisadores https://patronage.fapema.br/relatorios/vol_declaracaoobolista.php



GOVERNO DO ESTADO DO MARANHÃO
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO
CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Sr.(a) MARLA RAQUEL PONTES DA ROCHA, CPF: 629.662.402-59, é pesquisadora do Projeto "MIDAS PET & LIFE: PRODUTOS PARA O MERCADO PET" foi contemplado no EDITAL Nº 02/2019 CENTELHA - CHAMADA PÚBLICA DO PROGRAMA NACIONAL DE APOIO À GERAÇÃO DE EMPREENHENTOS INOVADORES, da Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão - FAPEMA, no período de 09/06/2021 até 09/06/2022.

Até a presente data está vinculado ao projeto.

São Luis, 24 de Novembro de 2021.

André Luis Silva dos Santos
 Diretor Presidente da FAPEMA



Dígito Verificador: 10
 Código de controle: 1011.0251.044C.00459
 A autenticidade deste comprovante deverá ser confirmada na página da FAPEMA,
 no endereço <http://www.fapema.br>

Rua Perdizes, nº 05, Qd 27, Jardim Renascença, CEP: 65075-240, São Luis - MA
 Fone: (98) 2109-1400 / 2109-1425 - www.fapema.br

1 of 1
24/11/2021 10:54