

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA SOBRE A
CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DÉRMICAS PROFUNDAS**

NÍVIA LUCAS DE OLIVEIRA

ARACAJU
JUNHO – 2010

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRASILEIRA SOBRE A
CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DÉRMICAS PROFUNDAS**

Dissertação de Mestrado
submetida à banca examinadora
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Saúde e Ambiente, na área de
concentração em Saúde e
Ambiente.

NÍVIA LUCAS DE OLIVEIRA

Orientadores: Prof^a Sônia Oliveira Lima, D.Sc.

Prof^o Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.

ARACAJU
JUNHO – 2010

O AUTOR PERMITE A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

Oliveira, Nívia Lucas.

Efeito de extratos de própolis brasileira sobre a cicatrização de queimaduras dérmicas profundas/Nívia Lucas de Oliveira;orientadores: Sônia Oliveira Lima, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior – Aracaju, 2010.

51 p.:Il.

Inclui bibliografia.

Dissertação(Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, 2009.

1. Propolis 2. Queimaduras 3. Cicatrização 4. Colágeno. I. Lima, Sônia Oliveira (orient). II. Júnior, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque (orient). III Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM SAÚDE E AMBIENTE

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM SAÚDE E AMBIENTE

Aprovada por:

Sônia Oliveira lima, D. Sc.
Orientador

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D. Sc.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Membro do Programa de Saúde e Ambiente

Patricia Meire Bento, D. Sc.
Membro Externo ao Programa de Saúde e Ambiente

Margarete Zanardo, D. Sc.
Membro do Programa de Saúde e Ambiente (suplente)

Luciana Valente Borges, D.Sc.
Membro do Programa de Saúde e Ambiente (suplente)

ARACAJU

JUNHO – 2010

iv

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO Stricto sensu EM SAÚDE E AMBIENTE

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	
CAPÍTULO 2. REVISÃO DA LITERATURA.	11
1. Queimaduras	12
2. Cicatrização	13
3. Cobertura ou Curativos dérmicos (Dressing)	16
4. Produtos Naturais	19
5. Referências	26
CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS.	
1. Obtenção do Extrato de Propolis	35
2. Determinação de Flavonóides Totais	35
3. Extração de Colágeno Tipo I	35
4. Obtenção do Filme Bioativo de Colágeno Contendo Própolis	36
5. Ensaio Biológico	36
6. Indução da Queimadura	37
7. Aplicação de Biomaterial	37
8. Sacrifício dos Animais e Obtenção dos Espécimes	38
9. Análise Morfológica do Infiltrado Inflamatório	39
10. Determinação do Grau de Epitelização	40
11. Procedimento de Coloração Imunohistoquímica	40
12. Análise Quantitativa de Miofibroblastos	41
13. Análise Estatística	42
CAPÍTULO 4. ARTIGO CIENTÍFICO – The incorporation of Brazilian Propolis into collagen-based films improves dermal burn healing.	
1. Abstract	45
2. Introduction	46
3. Material and Methods	47
3.1 Assessment of the Flavonoids Content	47
3.2 Preparation of the Films Containing Propolis	48
3.3 Burning Procedure and Groups Formation	48
3.4 Assessment of the Inflammatory Profile (IP) and Epithelization Rates (ER)	49
3.5 Determination of the Mean of Myofibroblasts Count (MC)	49
3.6 Assessment of the Collagen Deposition	49
3.7 Statistical Analysis	49
3.8 Ethics Aspects	50
4. Results	50
5. Discussion	52
Anexos	

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO Stricto sensu EM SAÚDE E AMBIENTE

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
HE	Hematoxilina/Eosina
Ep	Percentual de epitelização
Eex	Epitélio neoformado
Et	Extensão Total da ferida
ITP	Instituto de Tecnologia e Pesquisa
CTR	Grupo Controle sacrificado com 3, 7, 14, 21 e 30 dias
COL	Grupo Tratado com membrana de colágeno sacrificado com 3, 7, 14, 21 e 30 dias
GP _a	Grupo tratado com membrana de colágeno e própolis verde a 0,5% sacrificado com 3, 7, 14, 21 e 30 dias
GP _b	Grupo tratado com membrana de colágeno e própolis verde a 1,0% sacrificado com 3, 7, 14, 21 e 30 dias
RP	Grupo tratado com membrana de colágeno e própolis vermelha a 0,5%
UNIT	Universidade Tiradentes
CAPE	Éster fenético do ácido cafeico
EHAP	Extratos hidroalcoólicos de própolis

EFEITO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS BRASILEIRA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DÉRMICAS PROFUNDAS

Nívia Lucas de Oliveira

Filmes de colágeno vem sendo usados para melhorar o reparo cicatricial e alguns estudos pesquisam seu efeito biológico com a incorporação de produtos naturais. Tem sido demonstrado que a própolis verde apresenta várias atividades biológicas, como propriedades cicatrizantes, mas existem poucos relatos sobre a variedade vermelha. Este estudo objetivou analisar o efeito da incorporação de própolis verde e vermelha em filmes de colágeno sobre a cicatrização de queimaduras. Assim, filmes contendo extratos hidroalcoólicos de própolis foram preparados e aplicados em queimaduras dérmicas de ratos, distribuídos em 5 grupos (N=25): CTR (controle sem filme), COL (filmes de colágeno), GP_a (filmes de colágeno com própolis verde a 0,5%), GP_b (filmes de colágeno com própolis verde a 1,0%) e RP (filmes de colágeno com própolis vermelha a 0,5%). Os animais foram eutanasiados após 3, 7, 14, 21 e 30 dias e as áreas teciduais pós queimadura analisadas histologicamente. Não foram observadas diferenças entre os grupos em 3 dias. GP_a, GP_b e RP mostraram redução na infiltração inflamatória, mas apenas em RP evidenciou-se rápida maturação da reação de granulação. A reepitelização se apresentou mais avançada em GP_a, GP_b e RP em 7, 14 e 21 dias ($p < 0,05$). O número de miofibroblastos foi significativamente maior em RP em 14 e 21 dias ($p < 0,05$), mas não houve diferença entre os demais grupos e tempos. Quanto à colagenização, em 7 dias, houve maior deposição de colágeno III em GP_a, GP_b e RP, e substituição mais rápida do colágeno III por I em 14 dias nestes mesmos grupos. A deposição de colágeno I predominou em todos os grupos em 21 e 30 dias, mas apenas em RP, os feixes fibrosos exibiram arranjo grosseiramente entrelaçado semelhante à derme normal. Concluiu-se que o uso de filmes de colágeno com própolis acelera os eventos cicatriciais de reparo de queimaduras, e que os filmes com a variedade vermelha mostraram resultados significativamente mais eficientes.

Palavras-chaves: própolis, filmes, cicatrização, roedores.

Capítulo I - Introdução

1. INTRODUÇÃO

As queimaduras são feridas traumáticas causadas por agentes térmicos, químicos, elétricos ou radioativos (SERRA, 2006; MENDES, 2009). Ocorrem nos tecidos de revestimento do corpo animal determinando destruição parcial ou total da pele e seus anexos, podendo atingir camadas mais profundas como o tecido celular subcutâneo, músculos, tendões e ossos (SERRA, 2006).

Nos Estados Unidos, estima-se que, a cada ano, 1% da população tem injúria por queimadura e aproximadamente cem mil americanos precisam de internação hospitalar, sendo que dez mil desses queimados (10%) falecem durante a internação (BARRETO, 2001).

Segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, no Brasil acontece cerca de um milhão de queimaduras a cada ano, 200 mil são atendidos em serviços de emergência, e 40 mil demandam hospitalização. As queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no Brasil, perdendo apenas para outras causas violentas, que incluem acidentes de transporte e homicídios (VALE, 2005).

Há diversos produtos disponíveis para utilização em queimaduras tais como, agentes tópicos (soluções, cremes e produtos naturais) e substitutos de pele. A escolha do tratamento da ferida deve levar em consideração a localização, profundidade, extensão, presença ou não de infecção, agente causador do trauma, estado nutricional do paciente, presença de doenças crônicas degenerativas e faixa etária (FERREIRA et al., 2003).

Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa e cor variada, fabricada por abelhas *Apis mellifera*., utilizada para esterilizar, vedar e impermeabilizar a colméia (MANARA et al., 1999).

A própolis, sob a forma de extratos hidroetanólicos, vem se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas, tais como atividade antimicrobiana (BITTENCOURT, 2008; MARCUCCI et al., 2001; PARK et al., 1998; AHMED et al., 1996), antiinflamatória (SOSA et al., 1997; MOURA et al., 2009), cicatrizante (SOUZA, et al., 2009), antiulcerogênica (BARROS et al., 2007) e antiparasitária (PONTIN et al., 2008), quanto pela possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia, na forma de alimento funcional (ACKERMANN, 1991). A coloração e as propriedades terapêuticas da própolis dependem da sua composição química, origem botânica, localização geográfica e procedência (SANTOS et al., 2003; COUTO, 1996). Assim, a

própolis pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado (ADELMANN, 2005).

A própolis produzida no cerrado brasileiro é conhecida como própolis verde e tem como principal fonte vegetal à espécie *Baccharis dracunculifolia* (PARK et al., 2004). Já a própolis vermelha, apresenta como origem botânica a *Dalbergia ecastophiillum*(L) Taub. (Leguminosae), sendo esta uma variedade regional encontrada na região sudeste, sul e região nordeste, inclusive em Sergipe.(ALMEIDA, 2008).

Alguns estudos têm se concentrado em promover a incorporação de compostos bioativo (fármacos sintéticos ou produtos naturais) em biomateriais implantáveis, a exemplo do colágeno I, especialmente em virtude das vantagens relacionadas a uma aceleração do processo de granulação e epitelização e a liberação controlada do produto incorporado diretamente no tecido danificado (HELARY et al.,2006; LEE et al,2001). Destaca-se que além de apresentar propriedades físicas, químicas e estruturais bem elucidadas, essa glicoproteína tem não apenas se mostrado de fácil isolamento e purificação (HO et ali.,1997), mas também pode ser dispensada em distintas formas, como filmes e esponjas (SRIVASTAVA et al., 1990).

Segundo Rogenski (1998), existe atualmente em todo mundo, grande tendência para o aproveitamento de recursos naturais na terapêutica, por apresentarem vantagens econômicas, serem eficientes e apresentarem poucos efeitos nocivos à saúde.

Desta forma, a importância deste estudo reside na comprovação do efeito do extrato de própolis verde e vermelha sobre o processo de reparo cicatricial de queimaduras dérmicas profundas, o qual poderá ser inserido como tratamento alternativo em queimaduras em humanos, proporcionando uma cicatrização mais rápida, diminuindo o sofrimento e conseqüentemente o tempo de internação hospitalar.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Queimaduras

A pele é um órgão protetor e impermeável à água, que isola os componentes internos do meio externo, representando, portanto, uma barreira natural do organismo (SMELTZER,1993). É constituída por duas camadas principais, a epiderme e a derme. A epiderme é composta por um tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado que possui quatro tipos de células: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (HIB, 2003). A derme está dividida em duas camadas, a papilar, superficial, frouxa e a camada reticular mais profunda e muito mais densa (HIB, 2003; GARTNER, 2003; STEVENS,2001).

A derme papilar apresenta delicadas fibras de colágeno e elastina que se encontram arranjadas de forma mais dispersa e perpendicular à superfície da pele. E a camada reticular é constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, com grossas fibras de colágeno tipo I intimamente reunidas em grandes feixes dispostos principalmente em posição paralela à superfície da pele e redes de grossas fibras elásticas que estão enredadas com as fibras de colágeno (GARTNER, 2003).

Os agravos à pele em decorrência de traumas, como a queimadura promove alterações na homeostase humana, comprometendo assim, a sobrevivência do indivíduo. A queimadura pode ser causada por agentes térmicos, químicos, elétricos, biológicos ou radioativos que agem no tecido de revestimento do corpo humano, podendo destruir parcial ou totalmente a pele e seus anexos e até atingir camadas mais profundas, como tecidos subcutâneos, músculos, tendões e ossos (SERRA, 2006).

A queimadura de primeiro grau é a mais superficial, pois compromete só a epiderme (apresenta-se avermelhada e dolorida), a de segundo grau compromete a epiderme e parte da derme (caracterizando-se pela presença de bolhas) e a de terceiro grau compromete toda a epiderme e toda a derme, podendo apresentar-se com uma coloração que varia do esbranquiçado ao amarelo e do marrom ao negro (SERRA, 2006).

Histologicamente a ferida por queimadura é caracterizada principalmente pela necrose por coagulação com formação de três zonas distintas, denominadas zonas de Jackson (MONDRAGON, 1999). A primeira delas é a zona de coagulação, com uma coagulação vascular irreversível e nenhum fluxo sanguíneo capilar. A profundidade desta zona mais gravemente lesada é determinada pela temperatura e a duração da

exposição. Em torno desta encontra-se uma zona de estase, caracterizada por um lento fluxo sanguíneo capilar que embora lesado não foi coagulado e dependendo do tratamento realizado pode haver a recuperação do tecido com epitelização ou a morte celular com aprofundamento da queimadura. A terceira zona é aquela de hiperemia, que é a resposta inflamatória habitual dos tecidos saudáveis a lesões não-letais (DEMLING; 1993).

2.2 Cicatrização

O processo de cicatrização é uma seqüência contínua e orquestrada de eventos complexos que levam à regeneração, reconstituição e restauração proporcional da capacidade tensional das estruturas lesadas, sendo dividido em três fases principais: inflamatória, proliferativa e de maturação da cicatriz (SERRA, 2006, SINGER e CLARK, 1999). Outros autores classificam de uma forma mais completa dividindo o processo em cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (MANDELBAUM 2003).

Segundo COLLINS, 2006 a inflamação é uma reação complexa a vários agentes nocivos, como os microorganismos e células danificadas, geralmente necróticas, que consiste de respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas, podendo ser aguda ou crônica.

A inflamação aguda se inicia rapidamente e tem uma duração relativamente curta, de alguns minutos a várias horas ou alguns dias. Suas principais características são a exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. Já a inflamação crônica é caracterizada por infiltração de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos; destruição tecidual induzida pela persistência do agente nocivo ou pelas células inflamatórias e tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, efetuado através da proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e em particular, fibrose (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2006).

As primeiras células de defesa que chegam ao local da lesão são os neutrófilos que atuam no controle da infecção através da fagocitose, destruição de bactérias e lise de tecido desvitalizado, sendo que a deficiência de algumas dessas funções pode estar associada com o aumento da suscetibilidade à infecção. A atividade dos neutrófilos é acentuada por anticorpos lançados na ferida devido às alterações vasculares. Gradualmente, os neutrófilos diminuem em número e são substituídos por

outras células do sistema de defesa, uma das características da cronificação do processo (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2006).

A infiltração pelos macrófagos, que continuam o processo de fagocitose iniciado pelos neutrófilos, é um componente importante da inflamação crônica (MANDELBAUM; DI SANTIS E MANDELBAUM, 2003). A transição da inflamação aguda para a crônica ocorre quando não há uma resolução da resposta inflamatória aguda devido à persistência do agente nocivo ou há alguma interferência com o processo normal da cicatrização (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2006).

Os macrófagos são as células inflamatórias mais importantes da fase inflamatória. Permanecem do terceiro ao décimo dia, fagocitando bactérias, desbridando corpos estranhos e direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação (MANDELBAUM; DI SSANTIS E MANDELBAUM, 2003).

A eliminação dos tecidos desvitalizados por fagócitos típicos das fases mais iniciais da resposta inflamatória (neutrófilos e macrófagos) apresenta maior importância nas lesões dérmicas profundas. Estas células inflamatórias influenciadas pela baixa tensão de oxigênio, alta concentração de ácido láctico e pH baixo, são responsáveis pela produção de diversos fatores de crescimento e citocinas que iniciam o processo de reparo tecidual, atraindo fibroblastos e queratinócitos de áreas adjacentes à lesão (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Com o aumento da concentração local dos fatores de crescimento as citocinas se elevam, os processos de regeneração vascular e fibroplasia se intensificam através da angiogênese, migração e proliferação fibroblástica, formando um tecido rico em elementos vasculares, celulares e a produção do tecido de granulação, que aos poucos vai se alastrando, preenchendo o vazio resultante dos tecidos eliminados. Na fase precoce do processo cicatricial existe deposição de fibronectina e ácido hialurônico que propiciam uma atmosfera favorável para a movimentação celular. O avanço do processo modifica os substratos sintetizados localmente os quais passam a ser compostos por proteoglicanos que fixam as células, beneficiando a troca de fenótipo celular (BALBINO et al., 2005). À medida que se formam novas camadas de tecido de granulação, as mais antigas, profundamente situadas, vão perdendo sua riqueza em vasos, e os fibroblastos e feixes de colágeno passam a predominar (BALBINO et al., 2005).

A produção de colágeno (colagenização) na área da ferida representa um dos fatores mais significativos para a recuperação dérmica após uma agressão (DIELGEMAN, EVANS, 2004). O colágeno constitui um grupo de proteínas compostas

por três cadeias polipeptídicas dispostas em tripla hélice, e é o principal componente da matriz extracelular (MEC) perfazendo aproximadamente 25% da massa protéica total do organismo (GHADIALLY, 1997). De modo geral, as fibras colágenas se dispõem num padrão ondulado e exibem extensão bastante variada, e têm papel fundamental na arquitetura tecidual, na resistência dos tecidos e em uma ampla variedade de interações célula-célula e célula-matriz (RICH, WHITTAKER, 2005).

De acordo com relatos de JUNQUEIRA et al (1983), o colágeno pode ser classificado em dois tipos principais: os colágenos formadores de fibrila(tipo I, II e III) e os não – fibrilares (tipo IV). O colágeno tipo I é o mais abundante, ocorrendo em uma variedade de tecidos, fornecendo alta resistência à tensão da pele, tendões e ligamentos; o colágeno tipo II predomina em cartilagens hialinas e elásticas; e o colágeno tipo III está presente em virtualmente todos os tecidos conjuntivos em proporção variada ao colágeno tipo I. Os não- fibrilares formam um grupo heterogêneo que inclui os colágenos das membranas basais (tipo IV) (LINSENMAYER, 1991). Ainda deve ser destacado que a disposição arquitetural típica das moléculas de colágeno em feixes fibrosos é altamente relevante para geração de força tênsil em um tecido exposto à agressão (PUGLIESE *et al.*, 2003; RIBEIRO et al, 2009).

Durante o reparo cicatricial, a síntese de colágeno tem início em média no terceiro dia, atinge seu pico máximo em três a seis semanas e entra em fase de remodelação. O colágeno tipo III é inicialmente depositado, sendo gradativamente substituído por colágeno tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial (CARNEIRO *et al.*, 2005).

A utilização da técnica histoquímica de Picrossirius examinada sob luz polarizada apresenta marcante sensibilidade e especificidade para localizar as fibras colágenas (FONSECA, 2003). Podem-se distinguir diferentes tipos de colágenos através de padrões de cores, diferenças de diâmetro e arranjo estrutural das fibras (HIRSHBERG, BUCHNER e DAYAN, 1996; HIRSHBERG, BUCHNER e DAYAN, 1999). O colágeno tipo I se compõe de fibras espessas amarelas brilhantes, laranja ou vermelha; o tipo II se apresenta como fibras finas com cores variadas distintas das observadas no colágeno I; o tipo III está representado por fibras extremamente delgadas esverdeadas e amarelo-esverdeadas. Tem sido sugerido que as diferentes birrefringências observadas à polarização após o uso do Picrossirius permitem avaliar a fase do processo cicatricial, onde o colágeno encontra-se esverdeado ou amarelo esverdeado, em fase de cicatrização e altamente birrefringentes de cor laranja ou vermelha em processo fibrótico inativo. Assim, este método mostra-se bastante apropriado para avaliação da quantidade de deposição de colágeno em estudos que visam à avaliação da cicatrização (RABAU, DAYAN, 1994; RIBEIRO *et al.*, 2004).

Diversos fatores podem modular a síntese de colágeno e interferir na velocidade de deposição da matriz protéica, na sua maturação ou em seu arranjo organizacional durante o processo cicatricial (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003). Entre as estratégias utilizadas recentemente para modular o processo cicatricial, destaca-se o uso de membranas bioativas. As membranas contendo colágeno tem sido um dos materiais mais utilizados para reparar danos a traumas químicos e mecânicos, em especial em mucosas, devido a sua biocompatibilidade e sua capacidade para promover cicatrização de feridas (YAMATOOGI *et al.*, 2005). Além disso, foi demonstrado que matrizes de colágeno estimulam a proliferação de miofibroblastos sendo este um dos fatores primordiais para o reparo tecidual (HELARY *et al.*, 2006).

2.3 Coberturas ou curativos dérmicos (Dressings)

Além da limpeza e desbridamento, outro princípio importante da terapia tópica de feridas é a oclusão com as coberturas que podem ser classificadas como primária (aquelas que permanecem em contato direto com a lesão) e secundária (aquelas que ficam sobre a cobertura primária, podendo ser gazes, algodão, entre outros) (BLANDES, 2004).

Várias condutas terapêuticas têm sido empregadas para tratamento de queimaduras, desde água gelada, passando por enxertos, homoenxertos. Além disso, diversos agentes tópicos como antissépticos, antibióticos e curativos têm sido utilizados na tentativa de favorecer a cicatrização de feridas cutâneas (RAHAL *et al.*, 2001). Assim, na constante busca de alternativas que permitam tratar e minimizar as lesões à pele, principalmente em pacientes queimados, investigações têm dado origem a produtos extremamente diversificados, destacando-se, entre eles, os substitutos temporários de pele (FEREIRA *et al.*, 2008).

Os substitutos temporários de pele são materiais eficazes no tratamento de queimaduras superficiais recentes e também na cobertura da pele enquanto aguarda-se o enxerto definitivo, atuando como curativos. Podem ser trocados a intervalos regulares ou mantidos até a cicatrização ou enxerto, caso a aderência seja boa ou não haja infecção. Considera-se que há três linhas de substitutos temporários de pele (FERREIRA *et al.*, 2008):

- substitutos de origem animal, como enxerto homólogo, membrana amniótica, pele de porco, pele de embrião bovino e colágeno;

- substitutos elaborados à base de substâncias sintéticas, tais como silicone, poliuretano e *hydrom*;

- substitutos tal como colágeno e silicone.

Os substitutos temporários de pele podem ainda ser classificados em substitutos biológicos, que constituem os aloenxertos (homoenxertos), xenoenxertos (heteroenxertos) e membrana amniótica; e substitutos sintéticos que são compostos por membranas ou filmes constituídos de diferentes polímeros, como colágeno e silicone (FERREIRA et al, 2008).

Mandelbaum (2005) refere que um substituto temporário de pele que venha a ser utilizado como curativo deve possuir como qualidades: conforto; não exigência de trocas frequentes; boa relação custo-benefício; manter o leito da ferida com umidade local e as áreas periféricas secas e protegidas; facilidade de aplicação e remoção; adaptabilidade (conforme as diversas partes do corpo). BUSNARDO et ali., (2009) comentam que as características ideais para um substituto de pele são aderência, permeabilidade ao vapor d'água, elasticidade, durabilidade, constituição de uma barreira às bactérias, não ser antigênico, ter ação hemostática, ser de fácil aplicação e manuseio e de baixo custo.

O tipo de curativo apropriado para favorecer a cicatrização de uma ferida varia com a natureza, localização e tamanho da lesão. A seleção deve ser feita com base nas propriedades físicas de proteção e o tipo de perda cutânea. Além disso, os curativos apropriados podem ser selecionados de acordo com a fase do processo de cicatrização da ferida. Os aderentes são necessários na fase inflamatória por removerem restos de material necrótico ou estranho e exsudato. Os não aderentes podem ser usados quando a ferida encontra-se no estágio reparativo, com tecido de granulação e uma maior produção de exsudato sanguinolento, podendo ser semi-oclusivos ou oclusivos (LE MOS et al, 2008).

Segundo Mandelbaum (2005), os principais curativos dérmicos disponíveis no Brasil são:

- alginato de cálcio: composto de fibras de não-tecido, impregnadas de alginato de cálcio e sódio, extraídas de alga marinha *Laminaria*, contendo ácido algínico como princípio ativo. É quimiotático para macrófagos e fibroblastos; tem ação bacteriostática; promove agregação plaquetária; é biocompatível e biodegradável e auxilia no desbridamento autolítico.
- carvão ativado: composto por carvão ativado impregnado com prata, envolto por uma camada de não-tecido, selada em toda sua extensão. Remove o excesso do exsudato da ferida por absorção (carvão) e tem efeito bactericida (prata).

- filmes semipermeáveis: composto por película de poliuretano transparente, adesiva e estéril, semipermeáveis. Mantém a umidade e o pH natural da pele e agem com barreira a contaminação da ferida.
- hidropolímeros: almofadas geralmente compostas por três camadas sobrepostas, sendo uma central de hidropolímero, que se expande delicadamente, à medida que absorve o exsudato, e duas outras, formadas por não-tecido, não aderente, o que evita a agressão aos tecidos na remoção. Mantém o meio úmido ideal para a cicatrização.
- hidrogel: as placas são geralmente compostas por água, propilenoglicol e carboximetil celulose ou água e polivinilpirrolidona. Possui uma ação quimiotóxica para leucócitos; favorece a angiogênese; promove o desbridamento autolítico e mantém o meio úmido.
- hidrocolóides: composto por carboximetil celulose sódica, gelatina e pectina em sua camada interna, e espuma de poliuretano na camada externa. Em contato com o exsudato, formam um gel hidrofílico que mantém o meio úmido.
- protetores cutâneos: compostos por gelatina, pectina, carboximetilcelulose e polisobutileno. Tem ação de proteger a pele nas áreas periostomais e regiões adjacentes a feridas exsudativas e fístulas ou nos processos de dermatite de contato por extravasamento de líquidos.

Alguns materiais biológicos alternativos, empregados como curativo oclusivo, têm sido estudados e recomendados por vários investigadores por possuírem propriedades antibacterianas e analgésicas, acelerarem a formação de tecido de granulação e epitelização, propiciarem barreira à invasão bacteriana, assim como promoverem retenção do exsudato, características admitidas como benéficas para a cicatrização (FALCÃO et al., 2002). Destacam-se, entre eles, os filmes bioativos (membranas biológicas), constituídos de implantes orgânicos, livres, inertes e compostas quase que exclusivamente por colágeno, apresentando baixa antigenicidade (BUSNARDO et al., 2009).

As membranas ou filmes de colágeno têm sido amplamente utilizados como curativo para reparar danos a traumas químicos e mecânicos devido a sua biocompatibilidade e sua atividade pró-cicatrizante (YAMATOGLI et al., 2005). Além disso, tem sido demonstrado que matrizes de colágeno estimulam a proliferação de miofibroblastos sendo este um dos fatores primordiais para o reparo tecidual (HELARY et al., 2005).

Vários estudos buscando a melhoria do processo de reparo cicatricial vêm sendo realizados utilizando matrizes de colágeno como base para incorporação e posterior liberação controlada em tecidos-alvo de produtos bioativos da mais variada natureza (MAEDA et al, 2001; GOPINAT et al, 2004).

Almeida (2008) comentou que apesar da molécula de colágeno não exibir propriedades farmacológicas antiinflamatórias, sua utilização sob a forma de filmes oclusivos propiciou uma transição mais rápida do fenótipo leucocitário de polimorfo (neutrofílico) para mononuclear (linfocítico). No entanto, o autor ressalta que essa redução não pareceu estar associada à composição físico-química da membrana, mas sim à proteção mecânica da ferida, o que sabidamente reduz a contaminação microbiana e facilita a instalação e completude do reparo cicatricial.

BARRETO (2008) sugeriu que os benefícios promovidos pelo uso de filmes de colágeno sobre o processo de reparo poderiam também estar associados a íntima relação entre esta proteína (colágeno tipo I) e os fenômenos de proliferação e migração celular. Tais fenômenos se desenvolveriam provavelmente em resposta a ligação entre integrinas de superfície celular (ceratinócitos e fibroblastos) e esta molécula protéica, ativando receptores de uma série de proteínas quinases associadas ao ciclo celular (SHRIVASTAVA *et al.*, 1990; HAGA *et al.*, 2005). Assim, as moléculas de colágeno I parecem funcionar como uma matriz que orienta a migração celular durante a reparação cicatricial. (MORIMOTO *et al.*, 2005)

O efeito da incorporação da variedade sergipana da própolis vermelha em filmes de colágeno sobre a cicatrização de lesões dérmicas foi avaliado recentemente por BARRETO (2008) e ALMEIDA (2008), tendo sido observada a aceleração de eventos importantes do reparo cicatricial, como a formação e maturação da reação de granulação, epitelização e collagenização. Contudo ainda não existem trabalhos publicados que descrevam comparativamente o papel da incorporação de diferentes variedades da própolis brasileira em filmes de colágeno sobre a dinâmica do reparo cicatricial.

2.4 – Produtos Naturais

Existe atualmente em todo o mundo, grande tendência para o aproveitamento de recursos naturais na terapêutica, por apresentarem vantagens econômicas, serem eficientes e apresentarem poucos efeitos nocivos à saúde. A papaína (HERBA, 2001; MONETTO, 1987), a própolis (ALMEIDA, 2008) e o mel (RAHAL, 2003) são uma dessas alternativas naturais e vem sendo utilizadas com grande êxito em várias

instituições hospitalares para o tratamento dos mais diversos tipos de feridas (ROGENSKI,1998).

2.4.1 Própolis

Própolis é o nome genérico da substância resinosa de composição complexa coletada pelas abelhas a partir dos mais heterogêneos tipos de plantas. A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colméia (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998).

A própolis é coletada por abelhas a partir de diversas partes das plantas como brotos, botões florais, cascas e exsudatos resinosos. Durante a coleta as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13 – glicosidase presente em sua saliva, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados até suas respectivas agliconas (PARK et ali., 1997).

As abelhas usam esta substância para se protegerem contra insetos e microorganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colméia (isolamento térmico e contra inimigos), no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores. Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação (MARCUCCI, 1996), já que à própolis é também atribuída ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver (PARK et al., 1998).

No Brasil a espécie *Apis mellifera* é a mais utilizada na produção comercial de mel, sendo esta a que mais se presta a polinização, ajudando na agricultura, produção de mel, geleia, cera, própolis e pólen. O habitat das abelhas *Apis mellifera* é bastante diversificado e inclui savanas, florestas tropicais, desertos, regiões litorâneas e montanhas (PEREIRA et al., 2003).

O espectro de vôo de uma abelha *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 4 a 5 km em torno da colméia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para a própolis. Dessa maneira, a composição da própolis é um reflexo direto da flora vegetal da qual se servem as abelhas (ADELMANN, 2005).

Segundo TEIXEIRA et al. (2005), não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas se sabe que elas são seletivas nesta coleta. MARCUCCI (1996) refere que possivelmente a escolha da planta onde a abelha coleta a própolis esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um antisséptico.

Dessa forma, as propriedades da própolis variam de acordo com sua origem botânica. A coloração pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo de seu tipo e idade. O ponto de fusão é variável entre 60 -70°C sendo que pode atingir em alguns casos, até 100°C (MARCCUCI, 1996). A temperatura ambiente apresenta uma consistência maleável a rígida; o aroma balsâmico e resinoso; um sabor que oscila do suave balsâmico a forte e picante e uma granulometria heterogênea (BRASIL, 2001). A fragrância característica que a própolis possui, deve-se principalmente a presença de cerca de 30 óleos essenciais já determinados. Destes, o acetato de linalina, acetato de benzila, acetil benzóico são os óleos essenciais presentes no jasmim e lavanda (MATSUNO,1997).

As propriedades biológicas da própolis obviamente estão diretamente ligadas a sua composição química, e este é possivelmente o maior problema para a sua utilização em apiterapia. A composição química da própolis varia com a flora da região e época de colheita, como a espécie da abelha (no Brasil, o grau de “africanização” da *Apis mellifera*) e com a técnica empregada para obtenção do extrato. Fatores estes que exercem uma enorme importância nas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país (ADELMANN,2005)

No Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade da flora brasileira, assim como, até certo ponto, a habilidade bioquímica das abelhas em alterar a composição nativa ou adicionar componentes próprios à própolis (PERREIRA *et al.*, 2002).

Segundo ALENCAR *et al* (2005), a espécie *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), da família Asteraceae é a principal fonte vegetal utilizada pela abelhas *Apis mellifera* para a elaboração da própolis verde, produzida nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. O própolis verde, portanto constitui-se num produto tipicamente brasileiro e, devido ao fato de ser altamente eficaz no combate a uma serie de microorganismos é valorizada no mercado internacional, sendo que, somente no Japão, movimenta um mercado da ordem de setecentos milhões de dólares ao ano (NASCIMENTO, 2008).

A própolis recolhida de uma colméia, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelhas, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (MONTI *et al.*, 1983; CIRASINO *et al.*, 1987).

Os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavanóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2 B6, C, E, bem como diversos minerais (MENEZES, 2005). Contudo de todos estes, o maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, encontrados em todas as partes do reino vegetal, os quais junto com os ácidos carboxílicos modificados são componentes estratégicos na própolis, pois são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (BURDOCK, 1998).

Os flavonóides foram isolados pela primeira vez em 1930 a partir de laranjas e acreditava-se tratar de mais um novo membro da família das vitaminas sendo essa substância designada como vitamina P, verificando-se mais tarde tratar-se de um flavonóide (MACHADO, 2008).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Entre elas, pode-se citar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante e inibição enzimática. (MACHADO, 2008).

Os flavonóides são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas pelos animais (BEECHER, 2003; MANACH et al.; 2004). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, entre elas apigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina, kampferol etc., sendo que a presença e a concentração destes compostos são utilizadas como índice de qualificação de amostras de própolis (LU, et al., 2005).

Há grande controvérsia em relação ao teor de flavanóides nas amostras brasileira (PERREIRA, 2002). BANKOVA (1995) e SOUSA et al (2007) concluíram que as amostras de própolis brasileira apresentaram baixos teores de flavanóides totais e ésteres ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos. E como consequência desta composição química oscilantes da própolis, ocorre também uma variação nas suas atividades farmacológicas (MENEZES, 2005).

Embora a composição química da própolis seja um dado extremamente importante, suas distintas atividades farmacológicas podem também decorrer do sinergismo entre seus diversos compostos químicos (KROL et al., 1993). Destas substâncias com propriedades biológicas, nenhuma contribui mais para os efeitos observados na própolis do que os flavanóides (BURDOCK,1998).

A concentração de flavonóides totais nas amostras de própolis pode ser determinada pela complexação dos flavonóides presentes nas mesmas com o cation alumínio, formando complexos estáveis. Na análise espectrofotométrica este complexo fornece um desvio das bandas características dos flavanoides para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) e uma intensificação da absorção (ADELMANN, 2005).

Ensaios biológicos usando combinações isoladas revelam que os flavonóides exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos demonstrando efeitos antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antineoplásico, antioxidante, antihepatotóxico, antihipertensivo, hipolipidêmico, antiinflamatório e antiplaquetário (MACHADO, 2008).

MIRZOEVA & CALDER (1996), atribuíram a propriedade antiinflamatória à presença na própolis de compostos tais como a ácido cafeíco, a quercetina, a narigenuína e o éster fenetílico do ácido cafeíco (CAPE). Esta atividade sendo o resultado da supressão da síntese de prostaglandina e de leucotrienos pelos macrófagos. As propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras e feridas podem estar relacionadas com a atividade antioxidante da própolis (MENEZES, 2005) sendo que esta propriedade deve-se ao fato de que os flavonóides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (MARCUCCI, 1998).

ALMEIDA (2008) realizou um estudo para avaliar o efeito da própolis vermelha sobre a cicatrização de queimaduras de terceiro grau em modelo murino. Verificou-se que a utilização de biofilmes de colágeno bovino tipo I reconstituído com extrato hidroalcoólico de própolis (EHAP) a 1,0% mostrou-se bastante eficiente em acelerar o processo de reparo cicatricial por segunda intenção de queimaduras de terceiro grau.

BARRETO (2008), analisando o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em modelo experimental, após aplicação de membrana de colágeno contendo EHAP, concluiu que a associação entre as membranas de colágeno e a própolis vermelha promoveu melhores resultados no processo de cicatrização de segunda intenção em ratos.

SUTTA et al. (1974) utilizaram solução alcoólica de própolis verde no tratamento de feridas em animais domésticos, tanto em casos clínicos como experimentais. Esses pesquisadores observaram seu efeito epitelizante, considerando-a adequada para o tratamento de feridas após a eliminação da infecção.

DAMYANLIEV et al. (1982) aplicaram solução tópica de própolis (20 e 30%) em pacientes com feridas supuradas. Foi observado que a cicatrização ocorria dentro de um período de tempo menor do que as tratadas com pomada de Vishnevsky e 20% de

clorato de sódio. A solução exerceu efeito antimicrobiano “in vivo” sobre *Bacterium coli*, *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

Em continuação a linha de pesquisa SOENGIL et al. (2000) estudaram os efeitos da vaselina (grupo A), sulfadiazina de prata (grupo B) e própolis a 5% ou 10% (grupos C e D) em feridas de espessura total em coelhos. As taxas de fibras colágenas e epitelização dos grupos C e D excederam àquelas dos grupos A e B.

Com a intenção de avaliar a influência do mel e da própolis sobre a cicatrização de feridas limpas por segunda intenção RAHAL et al. (2003), concluíram mediante estudo histológico que o tratamento com mel e própolis produziu melhor cicatrização pela redução da resposta inflamatória, havendo reepitelização mais rápida com a própolis.

2.4.2 Papaína

A papaína é uma enzima derivada do vegetal *Carica papaya*, que tem a propriedade de decompor substâncias protéicas. Com efeito terapêutico, apresenta características bactericida/bacteriostático, antiinflamatório, debridante químico e bioestimulante, promovendo alinhamento das fibras colágenas evitando a formação de quelóides (CANDIDO, 2001).

Atribui-se a atividade protéica da papaína a presença de um radical sulfidrílico (SH) pertencente ao aminoácido cisteína (SILVA, 2003). Após o preparo a papaína é um pó de cor leitosa, com odor forte e característico, lembrando enxofre. É solúvel em água e glicerol, mas praticamente insolúvel em álcool, éter e clorofórmio. Pode ser inativada ao reagir com agentes oxidativos como ferro, oxigênio, derivados do iodo, água oxigenada, nitrato de prata, luz e calor (SANCHES, 1991).

Na indústria de alimentos a papaína é utilizada na fabricação de queijos e biscoitos, como amaciante de carne e clareador de cervejas (MONETTA, 1987; \park et al.; 1980; PIETRO, 2004; MARTINDALE, 2005). Na indústria cosmética é utilizada como um potente ingrediente ativo adicionado as preparações esfoliantes, devido à sua capacidade de hidrolisar ligações peptídicas de colágeno e queratina no estrato córneo da pele, removendo, assim, os debris celulares da epiderme (NIINIMAK et al., 1993). Na odontologia, a papaína está sendo incorporada à formulação com gel para remoção química da carie (SILVA, 2005), como agente tópico irrigador em tratamento de canais (DUARTE et al, 2001) e na remoção do tártaro (DAVANÇO, 2004).

A maior parte das aplicações clínicas da papaína de uso tópico objetiva o desbridamento de feridas e de queimaduras, de modo a acelerar o processo de cicatrização dessas lesões (HAX, 2009).

Tem seu uso indicado para todas as fases do processo cicatricial, para uso em feridas secas ou exsudativas com ou sem necrose. Normalmente são indicados nas concentrações de 2% (feridas com tecido de granulação), 4% a 6% (exsudato purulento) e 10% (tecido necrótico). Promove desbridamento químico, granulação e epitelização, estimula a força tênsil das cicatrizes (HAX, 2009).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA E.B. Estudo morfológico e morfométrico do efeito de filmes bioativos de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial de queimaduras de terceiro grau em ratos. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Patologia – Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE. 2008. 84p.

ADELMAN, J. Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/oxidante. Tese de Mestrado. Universidade do Paraná, Paraná, 2005.

ACKERMANN, T. Fast chromatography study of própolis crude. Food Chemistry, Oxon, v.42, n.2, p. 135-138, 1991.

AHMED, F.H. Antimicrobial activity of bee glue (propolis) extracts. Egypt J. Microbiol, Cairo, v.31, n.3, p. 423-435, 1996.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMAN, J.; PARK, Yong Kun. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Cienc. Rural* [online]. 2005, vol.35, n.4 2010

BALBINO, C.A.; PEDREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41(1) : 27-51, 2005.

BARRETO ALS. Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente – Mestrado – Universidade Tiradentes, Aracaju/SE. 2008. 97p.

BITTENCOURT, F. O. Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha. Dissertação de Mestrado, UNIT. ARACAJU, SE. BRASIL. 2008.

BLANES, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: <http://www.bapbaptista.com>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do abastecimento. Instrução normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis, conforme consta dos anexos desta instrução normativa. Publicada no Diário Oficial da União, 23/01/2008, Seção 1, p.18, 2001.

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

CARDOSO, J.C., Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma de gel desenvolvidas a partir do material modificado. Tese de Doutorado, USP, Ribeirão Preto, Brasil, 2005. 152p.

CARNEIRO, C.G.; SENNES, L.U.; SALDIVA, P.H.N.; TSUJI, D.H.; XIMENES FILHO, J.A. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fásia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 71(2) : 798-802, 2005.

CASTALDO S., CAPASSO F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 73(1) : 1-6, 2002.

COUTO, R. H. N. Apicultura: Manejo e Produtos. Funep, v.1 (1), p.89-91, 1996.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS. Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

DANTAS FILHO, A.M; AGUIAR, J.L.A.; ROCHA, L.R.M.; AZEVEDO, I.M.; RAMALHO, E.; MEDEIROS, A.C. Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 22(1) : 64-71, 2007.

DAMYANLIEV, R.; HEIKIMOV, K.; SAVOVA, E.; AGOPIAN, R. The treatment of suppurative surgical wounds with propolis. *Folia Medica*, v.24(2), p. 24-7, 1982.

DIEGELMANN, R.F.; EVANS, C.M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience.* v.9 : 283-89, 2004.

DEMLING, R.H; WAY, L.W. Queimaduras e outras lesões térmicas. In: Way LW, editor, Cirurgia: diagnostic e tratamento. Rio de Janeiro: Gaunabara Koogan, p. 170-80, 1993.

FALCÃO S. C; LOPES, S.L; COELHO, A. R. B; ALMEIDA, EL. Pele de Rana Catesbeiana como curativo biológico oclusivo no tratamento de feridas cutâneas produzidas em cães: Alterações macroscópicas e microscópicas resultantes da interação desses tecidos. Estudo preliminar. Acta Cir. Bras. May; 17(3): 151-159, 2002.

FERREIRA, E.; LUCAS, R.; ROSSI, L. A.; ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura. Rev. Esc. Enferm. USP. V. 37, n.1, p.44-51, 2003.

FLEISCHMAJER, R.; PERLISH, J.S.; BURGESSON, R.E.; SHAIKH-BAHAI, F.; TIMPL, R. Type I and type III interactions during fibrillogenesis. *Am NY Acad Sci.*; 580 : 161-175, 1990.

FONSECA, V.R.C.D. Quantificação da deposição de colágeno de submucosa de pregas vocais suínas após exereses de fragmento de mucosa a frio e uso de Mitomicina-C tópica. Dissertação de Mestrado, IPEM, Curitiba, PR, Brasil, 2003.

FRIEDMAN, D.W.; BOYD, C.; MACKENZIE, J.W.; NORTON, P.; OSLOM, R.M.; BEAK, S.M. Regulation of collagen in keloids and hypertrophic scars., *J Surg Res.* 134 : 1019-1025, 1993.

GARTNER, L.P.; HIATT, J. L. Tratado de Histologia. Guanabara Koogan, 2ª ed. Rio de Janeiro, RJ, 2003.

GHADIALLY, F.N. Extracellular matrix, *Ultrastructural Pathology of the cell and matrix*, 4 : 1307-1399, 1997.

GOPINATH, D; AHMED, M.R; GOMATHI, K; CHITRA; K; SEHGAL; P.K; JAYAKUMAR, R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials.* 2004 May;25(10):1911-7.

GOPINATH, D.; KUMAR, M.S.; SELVARAJ, D.; JAYAKUMAR,R. Pexiganan-incorporated collagen matrices for infected wound-healing processes in rat. *J Biomed Mater Res A*. Jun 1;73(3):320-31,2005.

GRÉGIO, A.M.T.; LIMA, A.A.S.; RIBAS, M.O.; BARBOSA, A.P.M.; PEREIRA, A.C.P.; KOIKE, F.; REPEKE, C.E.P. Efeito da Propolis mellifera sobre o processo de reparo de lesões ulceradas na mucosa bucal de ratos. *Estud. Biolog*, 27(58) : 43-47, 2005.

HAGA, H.; IRAHARA, C.; KOBAYASHI, R.; NAKAGAKI, T.; KAWABATA, K. Collective movement of epithelial cells on a collagen gel substrate. *Biophys J.*, 3: 2250-6, 2005.

HELARY, C., OVTRACHT, L., COULOMB, B., GODEAU, G., GIRAUD-GUILLE, M.M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. 27(25) : 4443-4452, 2006.

HO, H-O., LIN,L-H.; SHEU, M-T. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. *J. Contr. Rel.* v. 44 n. 2-3, p. 103-112, 1997.

HIB, J. Di Fiore: Histologia. Guanabara Koogan. Rio de janeiro , 2003.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Collagen fibbers in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picosirius red and polarizing microscopy. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 28(9) : 410-412, 1999.

HIRSHBERG, A.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. The central odontogenic fibroma and the hyper plastic dental follicle: study with Picosirius red and polarization microscopy. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 25(3) : 125-127, 1996.

JUNQUEIRA L.C.U.; MONTES G.S.; MARTINS J.E.C.; JOAZEIRO, P.P. Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry*, 79 : 397-403, 1983.

LEE,C.H.; SINGLA,A.; LEE,Y. Biomedical applications of collagen. *Int. J. Pharm.* 221 : 1-22, 2001.

LELIEVRE, E. ; BONVALET, C. ; BRY, X. Event history analysis of groups: the findings of an on-going research project. *Popul.* 1 : 11-38, 1998.

LINSENMEYER, T.F. In: *Hay Ed. Cell biology of extracellular matrix*. New York, Plenum. 1991.

LUSTOSA, Sarah R. et al . Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Rev. bras. farmacogn.*, João Pessoa, v. 18, n. 3, set. 2008 .

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Bol. Cent. Biol. Reprod., UFJF*, v. 26, p. 37, 2008.

MAEDA, M; KADOTA K; KAJIHARA, M; SANO, A; FUJIOKA Fujioka Sustained release of human growth hormone (hGH) from collagen film and evaluation of effect on wound healing in db/db mice. *J Control Release*. 2001 Dec 13;77(3):261-72.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An. Bras. Dermatol.*, 78(4) : 393-408, 2003.

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

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, v. 19 (5), p. 529-535, 1996.

MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; FONSECA, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39 : 455-462, 2005.

MARTINS, N.L.P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, Z.T. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (BABAÇU). Estudo controlado em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 21(3) : 66-75, 2006.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, 72 (3): 405-11, 2005.

MIRZOEVA OK., CALDER PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 1996, 55, 441-9.

MONDRAGON, P. Tratamiento de las quemaduras. *Bol Med Hosp Infant Mex.* V. 56, p. 459-70, 1999.

MORIMOTO, N.; SASO Y.; TOMIHATA K.; TAIRA T.; TAKAHASHI Y.; OHTA M.; SUZUKI S. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *J Surg Res.* 125 (1): 56-67. 2005.

NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). *Revista Brasileira de farmacognosia*. 18 (3): 379-386. 2008

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICIE, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 18(3), 1998.

PEREIRA, F.M., LOPES, M. T.R., CAMARGO R. C. R.; VILELA, S. L. O. Produção de mel. *Embrapa Meio-Norte - Sistema de Produção*, v. 3, p.2003.

PERREIRA, A. d. S., Seixas, F. R. M. S. e Neto, F. R. d. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quimica Nova*, v. 25, p. 321-326, 2002
Pharm., 55 : 423–430, 2005.

PUGLIESE, L.S.; MEDRADO, A.P.; REIS, S.R.A.; ANDRADE, Z.A. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Braz Oral Res.* 17(4) : 307-313, 2003.

RABAU, M.Y.; DAYAN, D. Polarization microscopy of picosirius red stained sections: a useful method for qualitative evaluation of intestinal wall collagen. *Histol. Histopathol.*, 9(3) : 525-528, 1994.

RAMOS, A.F.N.; MIRANDA, J.L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 13(4) : 698, 2007.

RIBEIRO, F.A.Q; BORGES, J.P; ZACCBI, F.F.S; GUARALDO, L. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with mitomycin C. *Laryngoscope.* 114(1): 148-152, 2004.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. J. morphol. Sci.* 22(2) : 97-104, 2005.

SEMENOFF SEGUNDO, A.; BOSCO, A. F.; DA MAIA, D.; RIBEIRO, R.V.; DE AGUIAR, E.B.H.; ROCATTO, G.E.G.D.; CIRILO, D.M.; BUZELLE, S.L.; SEMENOFF, T.A.D.V. Influência do aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia.* 17 (01) : 05-10, 2007.

SERRA, M.C.; MACIEL,E. Tratado de Queimaduras. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

SOENGIL, J.; SEONGSOO,K.; SEONGKOO, C.; SEOKHWA, C. Effect of propolis on healing of full-thickness skin wound in rabbits. *Korean Journal of veterinary Clinical Medicine*, v.17 (1), p. 62-73, 2000.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químicos e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 17 (1): 85-93, Jan./Mar. 2007

SOUSA, A. P. B; PASSOS, J. P. G.; PADILHA, F. F.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Efetividade da Delphinium staphysagria 6cH e 30cH em ensaios biológicos para cicatrização. *Brazilian Homeopathic Journal* V. 11, n. 1, p. 13-14, 2009.

SRIVASTAVA,S.; GORHAM, S. D.; FRENCH,D.A.; SHIVAS, A. A.; COURTNEY, J. M. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and lagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. *Biomaterials.* V. 11, p.155-161, 1990.

SUTTA, J.; HANKO, J.; JANDA, J.; TKAC, J. Experimental and clinical experiences in treatment of wounds in domestic animals by local application of an alcoholic solution of propolis. *Folia Veterinaria*, v.18, p. 143-7, 1974.

STEVENS, A.; LOWE, J. *Histologia Humana*. Manole Ltda. 2ª ed. São Paulo, 2001.

TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v.2, n.1, p.85- 92, 2005.

YAMATOIGI, R.S.; RAHAL, S.C.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; CESTARI, T.M.; LIM, A.F.M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. *Ciência Rural*. 35(4) : 837-842 , 2005.

Capítulo III – Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato de própolis

Foram utilizadas amostras de própolis verde originárias do sudeste brasileiro (Minas Gerais), cuja origem botânica da própolis é identificada como sendo *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), e de propolis vermelha da região nordeste (Sergipe, Brasil), de origem botânica ainda não totalmente estabelecida.

A extração foi realizada conforme a metodologia aplicada por PARK et al (1998). Foi utilizado 1g da amostra de própolis, passando por um processo de trituração e homogeneização e em seguida foram adicionados 100 mL de solução hidroalcolica 70%. A extração foi feita numa temperatura ambiente durante 24 horas sob agitação. Após a extração, a amostra foi filtrada e o solvente foi rotaevaporado. O pó obtido foi armazenado em tubo de ensaio estéril com rosca e mantido em refrigerador, a temperatura de +4°C a +8°C. O rendimento da extração foi calculado em relação à massa inicial de própolis utilizada e expresso em porcentagem.

Determinação de flavonóides totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada através do método descrito por Adelman (2005). Para determinar o teor de flavonóides totais nas amostras, foram adicionados volumes de 15 a 1000 µL dos extratos (concentrações de 5 a 100 mg/mL) a uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio 10 % e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/litro. O volume final foi completado para 5 mL com etanol a 80 %. As amostras foram homogeneizadas e após 40 minutos, em temperatura ambiente, a absorvância foi determinada através de um espectrofotômetro (modelo B572 – marca Micronal) no comprimento de onda de 415 nm. Para elaboração da curva de concentração padrão foi utilizada a quercetina nas concentrações de 5 a 50 µg/mL dissolvida em etanol e submetida ao mesmo tratamento que a amostra. Os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes de quercetina (mg de quercetina em 100 mg de sólidos totais).

Extração do colágeno tipo I

O colágeno foi obtido de tendão bovino após tratamento com NaCl, ácido acético 0,5mol/L e pepsina, segundo método descrito por CARDOSO(2005). O tendão

bovino foi colocado em acetona e posteriormente foi lavado com água destilada. Este material, após ser cortado em pequenos fragmentos, foi mantido em uma solução de NaCl 10% (m/v) a 4°C por 24 horas. Após esse período, o material foi lavado novamente com água destilada e mantido em tampão citrato 0,02mol/L em pH 4,3 por 48 horas. A homogeneização do material foi feita em 500 mL de ácido acético 0,5 mol/L, formando um gel do polímero. O material geleificado foi submetido a tratamento com pepsina na proporção 1:50, por 24 horas. Após este período, o material colagenoso foi precipitado por “salting out”, adicionando 5% de NaCl na dispersão. Após precipitação do polímero, o mesmo foi dialisado contra água destilada durante 2 dias, sendo as trocas da água destilada realizadas periodicamente. O material resultante foi acondicionado sob refrigeração (-5°C) até o momento do uso.

Obtenção do filme bioativo de colágeno contendo própolis

O colágeno foi redisperso em ácido acético 0,5mol/L. A concentração de polímero utilizada foi definida através de testes preliminares, a fim de se obter filmes mecanicamente viáveis. A concentração de polímero foi definida em 1,0%. A inclusão de plastificantes também foi testada nesta etapa do desenvolvimento para evitar filmes quebradiços, sendo definida a concentração de 20% de propilenoglicol em relação a massa polimérica.

O extrato seco de própolis foi solubilizado em propilenoglicol, o qual serviu como co-solvente e plastificante. A concentração de própolis verde foi igual a 0,5% e 1% e a da própolis vermelha 0,5% em relação à massa seca de polímero.

Os filmes foram obtidos através de “Casting process” que consiste em verter a dispersão aquosa do polímero com o plastificante (contendo ou não o princípio ativo) em suportes de polietileno. Estes suportes foram colocados em capela de exaustão e o solvente foi eliminado. Após esta etapa, os filmes foram retirados do suporte, cortados na dimensão de 2x2 cm e acondicionados em embalagens apropriada para esterilização.

Ensaio Biológico

Um total de 125 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar), provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal aproximadamente 200±50g foram divididos em 5 grupos de 25 animais cada (CTR -

controle, COL - animais tratados com filmes bioativos de colágeno, GPa – animais tratados com filmes bioativos colágeno contendo extrato de Própolis verde a 0,5%, GPb – animais tratados com filmes bioativos de colágeno contendo extrato de Própolis verde a 1,0% e RP – animais tratados com filmes bioativos de colágeno contendo própolis vermelha a 1%). Os animais foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha, que foram trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h e receberam água *ad libitum* e dieta padrão Labina®(Purina, São Paulo, Brasil). Após atingir o peso supracitado, os animais foram submetidos a procedimento de indução de queimaduras dérmicas na sala de experimentação animal do Biotério da UNIT/SE. Antes do início de todos os procedimentos experimentais, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tiradentes sob o parecer consubstanciado de nº 170508.

Indução da Queimadura

A indução da queimadura foi realizada no dorso de todos os animais, estes foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de cloridrato de Quetamina (Ketalar) 57,67mg/ml na posologia de 0,10 ml/100g, e Xylazina (Virbaxil) sendo diluída em soro na proporção de 1:9 e administrada na posologia de 0,25 ml / 100g. Após anestesia foi realizada tricotomia manual na região média do dorso e antissepsia com solução de Clorexidina a 2%. Utilizou-se um instrumental em bronze confeccionado segundo MEYER e SILVA (1999), com ponta ativa chata e plana, apresentando a dimensão de 1,0 cm². O aquecimento se deu pela chama azul do fogo do maçarico em contato direto com o bronze por um período de 40 segundos até que este atinja o rubro, neste momento o instrumental foi encostado no dorso do animal permanecendo por 20 segundos queimando a pele (MEIRELLES, 2005 (Figura 1).

Aplicação de biomaterial

As áreas dérmicas queimadas de cada animal foram lavadas com soro fisiológico e o excesso de soro removido com o auxílio de algodão seco estéril. No grupo CTR (controle) não houve a colocação de filme. Nos demais grupos os filmes bioativos foram aplicados delicadamente sobre a lesão, de acordo com o seguinte protocolo: grupo COL (colágeno), grupo GPa (colágeno contendo extrato de própolis verde a 0,5%), grupo GPb (colágeno contendo extrato de própolis verde a 1,0%), grupo RP (colágeno contendo extrato de própolis vermelha a 0,5%). Os filmes

bioativos recobriram toda a lesão com margens de 0,5cm além das bordas das queimaduras. Com o intuito de diminuir a carga microbiana presente nos filmes, esses foram submetidos a radiação UV cerca de 15 minutos antes de sua aplicação sobre a queimadura (figura 1).



Figura 1: Etapas dos procedimentos metodológicos. (a) Instrumento confeccionado para indução da queimadura, (b) procedimento de indução da queimadura, (c) área de procedimento experimental de indução da queimadura e (d) área de necrose já recoberta pelo biofilme.

Sacrifício dos animais e Obtenção dos espécimes.

Após o período experimental os animais foram então submetidos a eutanásia por anóxia em Câmara de Gás de CO₂ (modelo CGSCO2G – Marca Beiramar, onde receberam um fluxo de ar contendo 100% de CO₂, durante 15 minutos); depois de constatada a morte do animal através da cessação dos sinais vitais e opacificação da córnea, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes a área cicatricial. Para tal, foi utilizada lâmina de bistuti número # 15, montado em cabo Bad Parker. Em seguida, a ferida foi exircisada de forma elíptica, com margem de tecido ao redor da queimadura de 0,5cm, e esta foi acondicionada em frasco plástico contendo formol a 10% (tampão fosfato, pH 7,4) com volume aproximadamente igual a 10 vezes o volume da peça, onde permaneceu por um período igual a 24 horas. Posteriormente, estes foram hemisseccionados, desidratados em soluções crescentes de etanol a 70,

95 e 100° GL, diafinizados em xilol e incluídos em parafina (técnica histológica convencional). Secções histológicas de 5µm foram obtidas a partir das amostras emblocadas em parafina e posteriormente submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) para avaliação das características do processo inflamação-reparo e epitelização, ao método histoquímico Picrossírius, para análise do grau de deposição colagênica (fibroplasia) e imunihistoquímico, para quantificação de miofibroblastos.

Análise Morfológica do Infiltrado Inflamatório

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os seguintes critérios:

- Intensidade e tipo do infiltrado inflamatório
- Tipagem (categorização) do processo inflamatório

A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios:

Ausente (0) - quando não forem identificadas células inflamatórias.

Escassa (1) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituíram menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica.

Moderada (2) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituíram entre 10% a 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica.

Severa (3) - quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituíram mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica.

Após a categorização da intensidade, a reação inflamatória foi classificada de acordo com o(s) tipo(s) leucocitário(s) predominante(s) em:

Inflamação aguda – quando predominaram leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e/ou eosinófilos).

Inflamação subaguda – quando leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) e mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) estiveram presentes em quantidade semelhante.

Inflamação crônica inespecífica – quando predominaram linfócitos e/ou plasmócitos.

Inflamação crônica específica (granulomatosa) – quando predominaram macrófagos e/ou gigantócitos (células gigantes multinucleadas).

Determinação do grau de epitelização

O índice de reepitelização da superfície da úlcera por queimadura (área lesionada) foi avaliado observando-se a formação de epitélio pavimentoso estratificado na região correspondente a superfície da ferida cirúrgica.

Para obtenção deste índice, foram selecionadas 04 imagens previamente fotomicrografadas de cada secção histológica. Estas foram processadas em um software específico para morfometria **Image Tool**[®], onde foi determinado o número de pixels correspondente a área de extensão ocupada pela faixa de epitelização na superfície da ferida e a extensão total da superfície da ferida. Posteriormente foi determinado o percentual de epitelização (E_p) em cada caso, calculando-se a razão entre a extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado (E_{ex}) e a extensão total da úlcera por queimadura (Q_{ex}), multiplicado por 100, de acordo com a seguinte fórmula:

$E_p = (E_{ex} / Q_{ex}) \times 100$, onde:

E_p – Percentual de epitelização

E_{ex} – extensão superficial ocupada pelo epitélio neoformado

Q_{ex} – extensão total da úlcera por queimadura

Estudo morfológico das fibras colágenas

Secções histológicas de 5 μ m foram obtidas e submetidas à coloração Picrosirius Red para estudo da deposição colagênica. As secções foram analisadas em microscopia de óptica sob luz polarizada. Foi realizada a análise descritiva dos grupos, detendo-se na identificação do colágeno, classificação em tipo I ou III de acordo com a birrefringência apresentada (alaranjada ou amarelo-esverdeada, respectivamente), observação do aspecto morfológico das fibras (estiradas ou onduladas, delgadas ou espessas, curtas ou longas) e disposição dos feixes (reticulares, entrelaçados ou paralelos), tanto na porção superficial quanto profunda da ferida.

Procedimento de coloração imunohistoquímica

Inicialmente foram obtidos cortes parafinados de 3 μ m de espessura que foram montados em lâminas silanizadas. Em seguida foi realizada a 1ª desparafinização (a

quente) em xilol a 60°C por 30 minutos, a 2ª desparifinação (a frio) em xilol a temperatura ambiente por 20 minutos. Seguiu-se a hidratação dos cortes em etanol absoluto, etanol a 90%, a 70%, a 50% e lavagens em água corrente e destilada. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, em água oxigenada (10 volumes) em 5 banhos de 5 minutos cada. Já a recuperação antigênica foi realizada pela fervura em forno de microondas, com solução de ácido cítrico 10mM/pH 6,0, em dois ciclos de 12 minutos cada, em potência máxima (750W), foi deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente, seguido por lavagens em água corrente/destilada e solução salina tamponada com fosfato pH (PBS). Posteriormente realizou-se a incubação com o anticorpo primário (anticorpo anti *α-smooth muscle actin*, clone 1A4, Dako, Corp., Glomstrup, Denmark) diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS (1:200), em câmara úmida por 12 horas a 4°C. Foram realizadas 3 lavagens em solução de PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (LSAB Complex/HRP Duet, Mouse/Rabbit, Dako) por 30 minutos a 37°C na diluição de 1:500, seguido por 3 lavagens em tampão PBS. Foram então, incubadas com o complexo Streptavidina – Biotina (Dako) por mais 30 minutos, e reveladas com substrato cromogênico (3,3 diaminobenzidina – DAB, Sigma) misturando 120mg do cromógeno em 200ml de PBS mais 2 ml de água oxigenada 20 volumes e 2ml de DMSO, incubando-o em estufa de calor seco por 5 minutos a 37°C, seguido por lavagens em água corrente e finalmente em água destilada. As lâminas foram então contra-coradas com hematoxilina de Carazzi por 5 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Os cortes foram desidratados em 2 banhos de álcool absoluto, seguido pela diafanização em xilol por 10 minutos, mais 10 minutos em novo xilol e montagem das lâminas com Bálsamo do Canadá.

Análise quantitativa de miofibroblastos

Foram selecionados e fotomicrografados 10 campos histológicos (400x) em cada secção histológica, selecionados por casualização sistemática. De acordo com este procedimento, os campos são selecionados da esquerda para a direita e de cima para baixo, e para cada campo fotomicrografado, seguem-se dois campos desprezados, até que fosse obtido o total de dez campos. Para contagem de miofibroblastos, um retículo de integração com 100 quadrículas-testes foi superposto as imagens e contadas as células imunomarcadas que eram cortadas horizontal ou verticalmente pelos lados ou vértice de cada quadrícula. A média de miofibroblastos foi obtida somando-se o total de células imunomarcadas e dividindo-se pelo número de campos estudados.

Análise Estatística

Os dados obtidos a partir da análise da determinação da intensidade da reação inflamatória e deposição de fibras colágenas foram comparados entre os grupos experimentais e controles (3, 7, 14, 21 e 30 dias) de maneira puramente descritiva.

Para análise da existência ou não de diferenças estatisticamente significativas no índice percentual de epiteliação e número médio de miofibroblastos, as médias de cada grupo experimental e controle serão submetidos ao teste ANOVA (com extensão Tukey) para indicar se existia ou não diferença estatisticamente significativa entre as médias. Foram consideradas significativas diferenças quando o valor de p fosse menor ou igual a 0,05.

Capítulo IV – Artigo Científico

The incorporation of Brazilian Propolis into collagen-based films improves dermal
burn healing.

The incorporation of Brazilian Propolis into collagen-based films improves dermal
burn healing.

Nívia Lucas de Oliveira ^a, Enrik Barbosa de Almeida ^b, José Aloizio Souza Vieira-
Junior ^c, Rose Nely Pereira-Filho ^d, Nicodemos Teles de Pontes-Filho ^e, Juliana
Cordeiro Cardoso ^{a,b}, Sônia Oliveira Lima ^{a,d}; Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-
Júnior ^{a,c}

^a Post-Graduation Programa in Health and Environment, University Tiradentes,
Aracaju/SE, Brazil.

^b Department of Pharmacy, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil.

^c Department of Dentistry, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil.

^d Science and Technology Institute, Aracaju/SE, Brazil.

^e Department of Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife/PE, Brazil.

Correspondence to:

Prof. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior.

Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Bairro Farolândia, Aracaju/SE, Brazil.

CEP 49032-490. E-mail: ricardo_luiz@unit.br

Phone: +55 79 32182115/Fax: +55 79 32182190

Abstract

Some studies have been successful in incorporating natural products into collagen-based films in order to improve burn healing. Furthermore, it has been demonstrated that the Brazilian green propolis presents a wide range of biological activities, such as healing properties, but there are no reports regarding the red variety. The purpose of this study was to evaluate the healing properties of collagen-based films containing Brazilian green and red propolis on burn wounds in rodents. Collagen-based filmogenic dispersions were obtained using polyethyleneglycol as plasticizer, containing hydroalcoholic extracts of red or green propolis. Subsequently, burn wounds of 1cm² were performed in the dorsum of 125 *Wistar* rats, assigned into five groups (n=25) according to the dressing used: CTR (burn wounds), COL (collagen-based dressing), GPa and GPb (collagen-based films containing 0.5 and 1.0% of green propolis, respectively) and RP (collagen-based films containing 0.5% of green propolis). The animals were euthanized after 3, 7, 14, 21 and 30 days, and the inflammatory reaction, collagenization and myofibroblasts differentiation were histologically assessed. In 7 and 14 days, GPa, GPb and RP showed decrease of the neutrophils content and the inflammatory severity, respectively, but only RP presented formation of mature fibroblast-rich granulation tissue. Epithelization was advanced in GPa, GPb and RP in 7, 14 and 21 days ($p<0.05$), and the mean of myofibroblasts was higher in RP in 14 and 21 days ($p<0.05$). GPa, GPb and RP showed more rapid substitution of type-III for type-I collagen in 14 days, and improved the collagenization density in 21 and 30 days. However, only in RP, the collagen bundles were grossly interlaced resembling the normal dermal arrangement. We concluded that the use of collagen-based films containing both varieties of Brazilian propolis improved burn healing, and that the red propolis provided better results than the green one.

Keywords: propolis, collagen, burn healing.

Introduction

The skin works as a barrier to the environment, which is responsible for protecting the organism from water loss and penetration of harmful substances. If this barrier is disturbed by mechanical or thermal action, the skin starts a complex repair mechanism known as wound healing (Fu et al, 2007). The analysis of the kinetic of this biological process in response to different forms of dermal substitution is important for the development of efficient therapeutic products capable of stimulating the wound healing (Alborova et al, 2007)

Despite the fact that there have been many recent advances in dermal substitution and wound healing research areas of medicine, neither the commercially available products nor the materials currently described in experimental studies are able to fully substitute for natural living skin (Shakespeare, 2001). However, healing of dermal wounds with macromolecular agents such as natural polymers is preferred to skin substitutes owing to many advantages such as biocompatibility, nonirritant and nontoxic properties, and ease and safety of the application on dermis (Sezer et al, 2007).

Collagen films have been employed to improve the cicatricial repair of mechanical and chemical damages (Gopinath et al, 2005 ; Gopinath et al, 2004). Furthermore, in addition to the excellent biocompatibility properties presented by these films, it has been demonstrated that collagen matrices stimulate biological phenomena involved in the success of wound healing, such as myofibroblastic differentiation and fibroblastic proliferation (Helary et al, 2006).

Some studies have been carried out in order to incorporate bioactive compounds (synthetic or natural) within implantable materials, such as type-I collagen films (Gopinath et al, 2005 ; Gopinath et al, 2004). These modified films seem to provide controlled liberation of the incorporated product directly within the damaged tissue, and

promote acceleration of the granulation tissue development and epithelization process (Helary et al, 2006).

Hydroalcoholic solutions of propolis, a resinous product produced by bees, have been currently employed in improving the cicatricial repair (Ramos e Miranda, 2007). Biological activity of propolis might be related to its antimicrobial, anti-inflammatory and immunomodulatory properties (Castaldo e Capasso, 2002). Research relating propolis and wound healing has been carried out by using different vehicles, such as sponges (Moura et al, 2009) and ointments (Sehn et al, 2009), but there is still no study employing collagen-based dressing films. Besides, the majority of the papers are focused in the Brazilian green propolis, so that only some few studies pointing at the biological effects of the Brazilian red variety have been reported (Marquele et al 2005; Ayres et al, 2007).

Therefore, the aims of this study were to investigate the suitability of the collagen-based films containing hydroalcoholic extracts of two different varieties of Brazilian propolis (green and red) on the dermal burn healing in rodent model.

Material and Methods

Assessment of the flavonoids content. Flavonoids in propolis hydroalcoholic extracts were expressed as quercetine equivalent. Quercetine (Sigma, Germany) was used to make the calibration curve (standard solutions of 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 80.0 and 100.0 g.mL^{-1} in 80% ethanol (V/V)). 0.5 mL of a product (ethanolic solutions of propolis) was mixed with 1.5 mL 95% ethanol (V/V), 0.1 mL 10% aluminum chloride (m/V), 0.1 mL of 1 mol.L^{-1} potassium acetate and 2.8 mL water. A volume of 10% (m/V) aluminum chloride was substituted by the same volume of distilled water in blank. After

incubation at room temperature for 30 minutes, the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm.

Preparation of the films containing propolis. Collagen was obtained from bovine tendon through treatment with NaCl, acetic acid and pepsin (CARDOSO, 2005). Hydroalcoholic extracts of red propolis was solubilized in polyethylene glycol 400, which was employed as cosolvent and plasticizer. This solution was mixed to 1% collagen dispersion in acetic acid (0.5 mol/L) and the films were obtained by casting process. The final propolis concentration in the film was 0.5 and 1.0%. After solvent evaporation, the films were cut off in square shape (2x2cm), and sterilized using UV rays (20 min).

Burning Procedure and Groups Formation. A hundred twenty-five male Wistar rats (250 $\pm$ 50 g), supplied with food and water *ad libitum* in a temperature and humidity-controlled environment, were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylozine (100mg/kg - 5mg/kg). Second-degree burn wounds were performed in the back of the animals by the contact of a heated 1cm² standard-sized square-shaped copper plate with the skin for 10 s. Animals were handled in accordance with the principles of aseptic chain in order to avoid bacterial contamination. Subsequently, rats were randomly assigned into five groups (n=25): according to the dressing used: CTR (burn wounds), COL (collagen-based dressing), GP_a and GP_b (collagen-based films containing 0.5 and 1.0% of green propolis, respectively) and RP (collagen-based films containing 0.5% of green propolis). After 3, 7, 14, 21 and 30 days five animals of each group were euthanized in CO₂ chamber and the burned areas were removed, formalin-fixed and paraffin-embedded according to routine laboratorial techniques. Serial 5 μ m thick histological sections were obtained and stained by histochemical and immunohistochemical techniques.

Assessment of the inflammatory profile (IP) and epithelization rates (ER). The IP was classified as acute (predominance of polymorphonuclear cells) and chronic (predominance of mononuclear cells), and graded as mild/absent (1), moderate (2) or severe (3). The ER was evaluated by measuring the epidermal migration from the normal wound margin to the point where the migrating epithelium stopped processing by using a morphometry software (ImageTool[®]). ER (%) was determined by the relation between the new epithelium present in the burn wound surface and total area of the burn wound surface.

Determination of the mean of myofibroblasts count (MC). Myofibroblastss were detected by using a monoclonal antibody against the α -smooth muscle actin antigen (clone 1A4; 1:200, 12 h, Dako, Glostrup, Denmark). After washing in PBS, slides were incubated with biotin-labeled antimouse secondary antibodies (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), then washed in PBS, and incubated with peroxidase-labeled streptavidin (DAKO). The reaction products were visualized by immersing the slides in freshly prepared diaminobenzidine (Dojindo, Kumamoto, Japan). Ten histological sections (x 40, 10 ocular, 0.739 mm² per field) were randomly selected and the mean of immunostained cells was assessed.

Assesement of the collagen deposition. Histological sections stained in picrosirius and analyzed under polarized light were used to the descriptive analysis of the collagen deposition. Collagen fibers were analyzed according their birefringence pattern (greenish/yellow-greenish or orange, orange-reddish), morphological appearance (wavy or stretched, thin or thick, short or long) and disposition (parallel-arranged or interlaced).

Statistical analysis. Statistical significance of the quantitative measurements was assessed by analysis of variance (one-way ANOVA) and Tukey test. Each time point

was analyzed separately, and two-tailed α -levels of $P < 0.05$ were regarded as significant.

Ethics aspects. In accordance to the institution's guidelines outlined in "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", it is hereby assured that all animals received humane care during all the steps of the experimentation. Furthermore, the study protocols were approved by our National Research Council prior to the beginning of the experiments.

Results

The yield of the hydroalcoholic extraction process of the green propolis was 41.43%, whereas the red propolis was 48.8%. On the basis of calibration curves for standard flavonoids, the concentration of these bioactive compounds in hydroalcoholic extracts of both propolis samples was assessed. The content of flavonoids of the green propolis was $0.95 \pm 0.44\%$, whereas the red propolis presented $1.87 \pm 0.26\%$.

On clinical evaluation, only CTR group exhibited peripheral hyperemic halo surround the burn wounds until 7 days. The adaptation of the dressings was fully satisfactory. Besides, all films were completely resorpted in 14 days.

As presented in table 1, in 3 days, the inflammatory infiltrate was moderate and limited to the margins of the burn wounds in all groups. Despite all groups showed severe inflammation in 7 days, an extensive infiltration of neutrophils was found in CTR and COL, whereas granulation tissue was seen in GPa, GPb and RP, particularly in the bottom of the burn wounds. In 14 and 21 days, there was a remarkable decrease in the severity of the inflammation content in the groups dressed with collagen-based films containing propolis. In 30 days, inflammation was inconspicuous in all groups.

However, in RP it was possible to observe the progressive regeneration of cutaneous appendages (figure 1- HE stain).

Despite in 3 days the epithelization process had been inconspicuous in all groups, the ER was significantly higher in GPa, GPb and RP than in CTR and COL in 7 ($p=0.000$), 14 ($p=0.000$), 21 ($p=0.005$) and 30 days ($p=0.015$). However there was no difference within the groups dressed with propolis-containing films or within CTR and COL ($p>0.05$) (figure 2).

The MC increased progressively from 3 to 14 days, and then started to slowly decrease until 21 days (figure 3). No significant difference was observed among the groups in 3, 7 and 30 days. Notwithstanding, the MC was significantly higher in RP in 14 ($p=0.00$) and 21 days ($p=0.04$).

In 3 days, all groups exhibited deposition of short thin delicate collagen fibrils, greenish birefringence (type-III collagen) and reticular arrangement. The same pattern of collagenization was observed in CTR and COL in 7 days, whereas in GPa and GPb some few thicker yellowish and orange fibers (type-I collagen) were found. Besides, in RP, these Type-I collagen were abundant and parallel-arranged. In 14 days, there was almost full replacement of type-III for type-I collagen, but the arrangement of the fibers was still reticular in CTR, parallel in COL, GPa and GPb, and slightly interlaced in RP. In 21 days, the collagen deposition was quite dense in all groups, but the arrangement was parallel in CTR and COL and interlaced in the other groups. In 30 days, all groups exhibited dense deposition of thick gross interlaced type-I collagen bundles associated to some few thinner type-III collagen fibrils in the papillary dermis. Furthermore, the density and highly interlaced appearance of the repaired dermal collagen observed in RP strongly resembled the histological features seen in the normal dermis of rats (figure 5).

Discussion

The extraction yield was 41.43% for the green propolis and 48.8% for the red propolis, both values higher than the minimum one (35%) specified in the Brazilian legislation (Brasil, 2001).

The concentration of flavonoids was assessed in both propolis samples collected from ten different localities in Brazil. The fact that the red propolis (collected from Sergipe - in Brazilian Northeast) presented higher contents of flavonoids than the green propolis (collected from Minas Gerais - Brazilian Southeast) suggests that the phytogeographic position of the hives might influence the physicochemical characteristics of propolis. However, the content of flavonoids of both samples were regarded as satisfactory, although they were lower than the values reported in previous studies (Silva et al, 2007; Chang et al, 2008). Flavonoids, one of the main group of phenolic compounds in propolis, are the key compounds for estimation of propolis quality, and the content of flavonoids has been implied in the biological activities of propolis. The biochemical effects of flavonoids can be divided into four categories: binding affinity to biological polymers; binding of heavy metal ions; catalysis of electron transport; and ability scavenge free radicals (Coneac et al, 2008). The ability to inhibit the incorporation of thymidine, uridine, and leucine into carcinoma cells, and block the DNA synthesis, presented by some flavonoids provides some antitumoral effects to the propolis. Besides, the flavonoids pinocembrin, galangin and pinobanksin, in addition to p-coumaric acid benzyl ester and caffeic acid phenethyl ester (CAPE), might probably be responsible for the antimicrobial activity of propolis (Havsteen, 2002).

The decrease of the inflammatory infiltrate observed in the groups treated with propolis-containing collagen-based films might be related to the wide range of

immunomodulatory effects of the propolis, such as inhibition of prostaglandin synthesis and stimulation of phagocitary activity of macrophages (Russo et al, 2002; Orsolić & Basić, 2003; Ramos & Miranda, 2007). Therefore, the incorporation of propolis hydroalcoholic extracts into the films might provide reduction of prostaglandin-induced chemotactic stimuli and more rapid phagocytosis-associated microbial elimination, which could consequently improve the healing process. Furthermore, the early development of granulation tissue suggests that the biological events that characterize the healing dynamics are taking place more rapidly in the groups treated with propolis-containing collagen-based films. The reason for the maintenance of intense inflammation in the group treated only with collagen-based films lays on the fact that, although collagen presents plenty of biomodulatory effects, these molecules do not exhibit anti-inflammatory activity (Srivastava et al, 1990).

The epithelization process is important for wound healing, ensuring that the new formed epithelium binds to dermis and sticks to tissue, as stated in previous reports (Erdağ e Sheridan, 2004). In this study, the epithelization rates were highly improved by using propolis-containing collagen-based films. These data are supported by previous studies demonstrating that type-I collagen molecules may work as a matrix which orientates the migration of keratinocytes, add to endothelial cells, fibroblasts and leukocytes (Morimoto et al, 2005). Caffeic acid esters and similar molecules present in propolis have been proved to stimulate migration of dermal keratinocytes (Brudzynski & Carlone, 2004). Recent studies also demonstrated that a wide variety of Brazilian propolis is able to induce macrophage activation under stress conditions (Missima & Sforcin, 2008). This immunomodulatory property could be indirectly related to the epithelization process, since activated macrophages release expressive amount of FGF (Logan et al, 1992), a cytokine involved in epithelial proliferation process (Werner &

Grose , 2003). Furthermore studies have demonstrated intimate relation between epithelization and fibroplasia (fibroblastic proliferation and collagen deposition) (McDougall et al, 2006), demonstrating the relevance of the epithelial recovering for the success of the burn healing.

As also presented in the figure 1 (immunohistochemical stain) RP exhibited more evident myofibroblastic differentiation in 14 and 21 days. Myofibroblasts are fibroblasts rich in actin that present contractile properties and promote wound contraction (Ribeiro et al, 2009). Therefore, it is suggested that the use of collagen-based films containing hydroalcoholic extracts of red propolis could contribute to the formation of a more retracted final collagenic scar, and maybe minimize the risk of the development of hypertrophic scars or keloids.

The dynamics of collagenization is extremely relevant to assess the success of the healing process (Ribeiro et al, 2009a). It has been demonstrated that type-III collagen is initially produced by fibroblasts in order to orientate the proliferation and migration of fibroblasts and endothelial cells during the formation of the granulation tissue (Ramos e Miranda, 2007; Fleischmajer et al, 1990 ; de Giacomo et al, 2005), and then it is gradually substituted for type-I collagen to provide tensile force and mechanical stability of the dermal fibrous connective fibrous tissue (Friedman et al, 1993). Based on this, the biological phenomena of collagen synthesis, deposition and maturation during wound healing seemed to be improved in GPa, GPb and RP. Besides, the biological property of proliferative endothelial orientation during the granulation tissue formation can explain the fact that these type-III collagen was more abundant in CTR and COL in 7 days, when the granulation tissue was still in progress, and less distinguishable in propolis-containing collagen-based films dressed groups, where the

well-developed granulation tissue had already installed, and endothelial growth orientation was no longer required.

For the other hand, type-I collagen deposition was progressing, once it is responsible for the tensile strength of the scar (Junqueira et al, 1983). In 14 days, all the groups presented absolute predominance of birefringent fibers consistent with type-I collagen. These data confirm *in vivo* findings on the healing phase of burn healing documented in previous study (Provenzano et al, 2005). However, the collagenization was more advanced in the groups dressed with propolis-containing collagen-based films. These findings might be related to the stimulatory activity of some varieties of Brazilian propolis upon FGF synthesis, a cytokine involved in the dynamics of fibroblasts proliferation and collagen synthesis and deposition (Narine et al, 2006), but other studies are necessary to clarify this theory. Furthermore, the interlaced orientation of the collagen bundles found in RP since the 14th day is strongly suggestive that the collagenization was more advanced and better organized in this group, as long as this particular arrangement appears to mimic the architecture of the normal dermis (Junqueira et al, 1983; Ostrovskii et al, 1992).

No substantial difference was observed between GPa and GPb, suggesting that the difference in the concentration of the hydroalcoholic extract of green propolis incorporated into the collagen-based films did not modify the dynamics of the dermal cicatricial repair.

However, the development of cutaneous appendages within the cicatricial area in RP, higher myofibroblastic differentiation and dense organization of the interlaced collagen scar, are indicative that the healing process, and consequently full recovery of the morphofunctional properties of the injured dermis, was more advanced in this group. The reason for these results is still hardly justifiable, but it might be related to the

content of flavonoids found in the red propolis extracts. A Study has suggested that the healing properties of propolis are the anti-inflammatory and antioxidant potential provided by the flavonoids (Marquele et al, 2005). Since the content of flavonoid found in the red propolis extracts was higher than that observed in the green ones, the better results obtained with RP might be related to the concentration of these bioactive compounds.

Some steps of the healing process, such as collagenization and epithelization, were clearly more advanced in COL than in CTR, despite these differences had not been statistically significant. These findings appear to be related to mechanical protection of the wounds provided by the dressing films, which consequently would reduce bacterial contamination, and facilitate the development of the granulation tissue (Diegelmann & Evans, 2004).

Based on the findings reported in this study, it is suggested that collagen films containing Brazilian propolis was efficient in improving wound healing process when employed as wound dressing for dermal burn healing.

Acknowledgements: We would like to thank CNPq and FAPITEC for the financial support.

References

Fu X, Fang L, Li H, Li X, Cheng B, Sheng Z. Adipose tissue extract enhances skin wound healing. *Wound Repair Regen.* 2007;15(4):540-8.

Alborova A, Lademann J, Meye L., Kramer A, Patzelt A, Sterry W, Antoniou C. Application of laser scanning microscopy for the characterization of wound healing. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*. 2007;2(2):Doc37

Shakespeare P. Burn wound healing and skin substitutes. *Burns*. 2001;27:517Y522.

Sezer AD, Hatipoğlu F, Cevher E, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2007 May 24;8(2):Article 39.

Gopinath D, Kumar MS, Selvaraj D, Jayakumar R. Pexiganan-incorporated collagen matrices for infected wound-healing processes in rat. *J Biomed Mater Res A*. 2005 Jun 1;73(3):320-31.

Gopinath D, Ahmed MR, Gomathi K, Chitra K, Sehgal PK, Jayakumar R...Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*. 2004 May;25(10):1911-7.

Helary C, Ovtracht L, Coulomb B, Godeau G, Giraud-Guille MM. Dense fibrillar collagen matrices: a model to study of myofibroblast behaviour during wound healing. *Biomaterials*. 2006 Sep;27(25):4443-52.

Ramos AFN, Miranda JL. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 2007 Nov;13 (4):698-710.

Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002 Nov;73(suppl 1): S1-S6.

Marquele FD, Di Mambro VM, Georgetti SR, Casagrande R, Valim YM, Fonseca MJ. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 2005 Sep;39(3/4):455-62.

Ayres D.C., Marcucci M. C., Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* . 2007 Mar;102(2):215-220.

Cardoso JC. Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma gel desenvolvidas a partir do material modificado. 2005. 152p. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005.

Park YK, Ikegari M, Abreu JAS, Alcici NMF. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*. 1998 Aug;18(3):313-318.

Srivastava S, Gorham SD, French DA, Shivas AA, Courtney JM. In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials. *Biomaterials*. 1990 Apr;11(3):155-61.

Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*. 2004 Jan 1;9:283-9.

Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*. 2002 Nov;73 Suppl 1:S21-9.

Orsolić N, Basić I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J Ethnopharmacol*. 2003 Feb;84(2-3):265-73.

Erdağ G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. 2004 Jun;30(4):322-8.

Morimoto N, Saso Y, Tomihata K, Taira T, Takahashi Y, Ohta M, Suzuki S. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation. *J Surg Res*. 2005 May 1;125(1):56-67.

Brudzynski K, Carlone R. Stage-dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)--immunocytochemical evidence of a CAPE-evoked delay in mesenchyme formation and limb regeneration. *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2004 May 1;301(5):389-400.

Missima F, Sforcin JM. Green brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 Mar;5(1):71-5.

Logan A, Frautschy SA, Gonzalez AM, Baird A. A time course for the focal elevation of synthesis of basic fibroblast growth factor and one of its high-affinity receptors (flg) following a localized cortical brain injury. *J Neurosci*. 1992 Oct;12(10):3828-37.

Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):835-70.

McDougall S, Dallon J, Sherratt J, Maini P. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2006 Jun 15;364(1843):1385-405.

Junqueira LC, Montes GS, Martins JE, Joazeiro PP Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study. *Histochemistry*. 1983;79(3):397-403.

Ostrovskiĭ AA, Levé OI, Shatrova VO. The development of the interfollicular epidermis in rats following autotransplantation. *Morfologiya*. 1992 Jun;102(6):105-12.

Dantas Filho AM, Aguiar JL, Rocha LR, Azevedo IM, Ramalho E, Medeiros AC. Effects of the basic fibroblast growth factor and its anti-factor in the healing and collagen maturation of infected skin wound. *Acta Cir Bras*. 2007 Mar-Apr;22 Suppl 1:64-71.

Fleischmajer R, Perlish JS, Burgeson RE, Shaikh-Bahai F, Timpl R. Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1990; 580:161-75.

de Giacomo C.C., Sennes LU, Saldiva PH, Tsuji DH, Ximenes Filho JA. Assessment of collagen deposits after implant of fascia lata and fat in the vocal folds of rabbits: histomorphometric study. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)*. 2005 Nov-Dec;71(6):798-802.

Friedman DW, Boyd CD, Mackenzie JW, Norton P, Olson RM, Deak SB. Regulation of collagen gene expression in keloids and hypertrophic scars. *J Surg Res.* 1993 Aug;55(2):214-22.

Provenzano PP, Alejandro-Osorio AL, Valhmu WB, Jensen KT, Vanderby R. Intrinsic fibroblast-mediated remodeling of damaged collagenous matrices in vivo. *Matrix Biol.* 2005;23:543Y555.

Narine K, De Wever O, Van Valckenborgh D, Francois K, Bracke M, DeSmet S, Mareel M, Van Nooten G. Growth factor modulation of fibroblast proliferation, differentiation, and invasion: implications for tissue valve engineering. *Tissue Eng.* 2006 Oct;12(10):2707-16.

Havsteen B.H., The Biochemistry and Medical Significance of the Flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics* 2002, 96, 67– 202

Chang R, Piló-Veloso D, Morais SAL, Nascimento EA. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Rev. bras. farmacogn.* 2008; 18(4): 549-556.

Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008 Sep;5(3):313-316.

Coneac G, Gafițanu E, Hădărugă DL, HădărugăNG, Pînzaru LA, Bandur G, Urșica L, Păunescu V, Gruia A. Flavonoid Contents of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activity. 53(67), 1-2, 2008.

Table 1. Semiquantitative assessment of the inflammatory infiltrate within the burn wounds in the experimental groups.

Time (days)	Animals	Experimental groups				
		CTR	COL	GP _a	GP _b	RP
3*	R1	2a	2a	1a	2a	2a
	R2	1a	2a	2 a	1a	2a
	R3	1a	1a	1a	1a	1a
	R4	1a	1a	1a	2a	2a
	R5	2a	1a	2a	1a	1a
7	R1	3a	3sa	3sa	3c	3c
	R2	3a	3sa	3sa	3c	3c
	R3	3a	3a	3c	3c	3sa
	R4	3a	3sa	3c	3sa	3c
	R5	3a	3a	3c	3c	3c
14	R1	3c	3c	3c	2c	2c
	R2	3sa	3c	2c	2c	2c
	R3	3c	2c	2c	2c	2c
	R4	3c	3c	2c	2c	2c
	R5	3sa	3c	3c	2c	2c
21	R1	2c	2c	1c	2c	1c
	R2	2c	2c	2c	1c	1c
	R3	2c	2c	1c	1c	2c
	R4	2c	2c	1c	2c	1c
	R5	2c	2c	1c	2c	1c
30	R1	1c	1c	1c	0	0
	R2	1c	1c	0	1c	1c
	R3	1c	1c	1c	0	0
	R4	1c	1c	0	1c	0
	R5	1c	1c	0	1c	0

[*] –infiltrate limited to the margins of the burn wounds; **[3]** – Intense infiltrate (more than 50% of inflammatory cells); **[2]** moderate infiltrate (between 10 and 50% of inflammatory cells); **[1]** –mild infiltrate (less than 10% of inflammatory cells); **[0]** – lack of infiltrate/ **[a]** – acute infiltrate (neutrophils-rich); **[sa]** – subacute infiltrate (composed of polymorphonuclear and mononuclear inflammatory cells); **[c]** – chronic infiltrate (predominantly composed of lymphocytes and/or plasma cells).

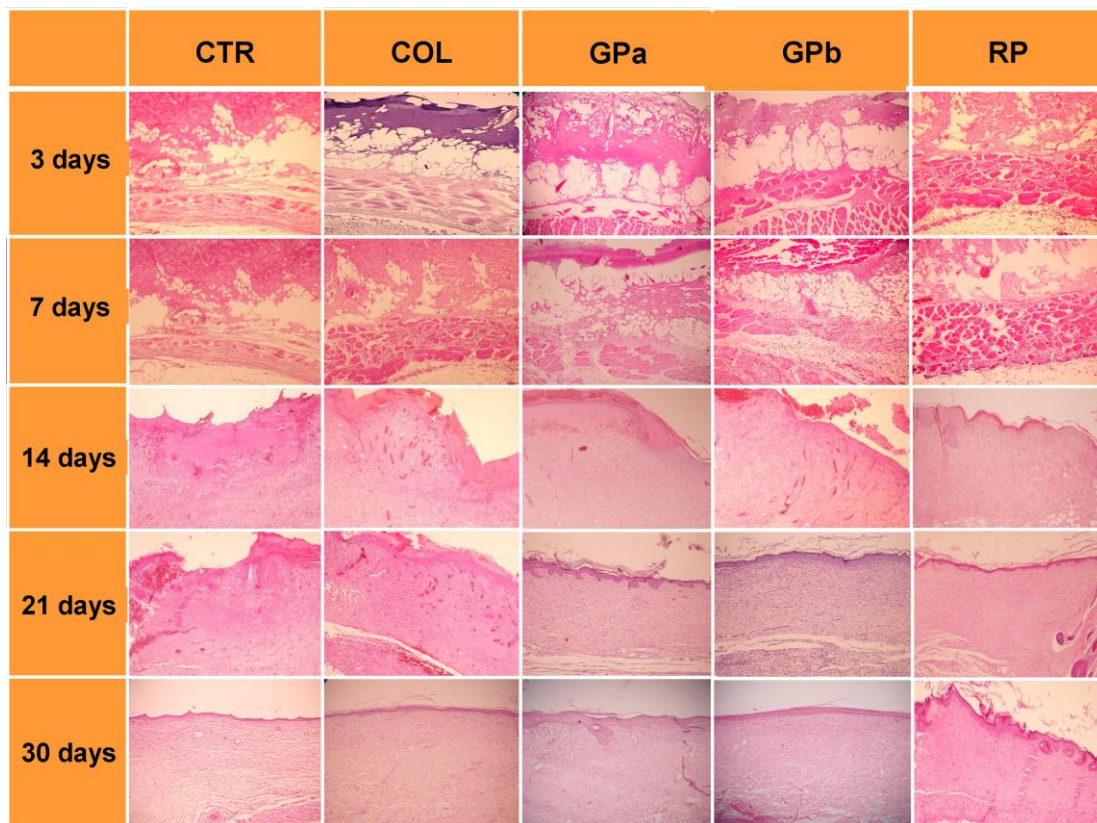


Figure 1. Inflammatory dynamics in the experimental groups. Acute infiltrate was mild in three days but expressive in seven. Chronic infiltrate was associated to immature (blood capillaries-rich) granulation tissue in CTR and COL, in opposition to the mature (fibroblasts-rich) granulation tissue seen in GPa, GPb and RP in 14 days. In 21 days, there was still a mature granulation tissue in CTR and COL, whereas GPa, GPb and RP presented early fibrous scar with delicate appearance. In 30 days, a gross well-formed fibrous scar was seen in GPa, GPb and RP, but only in the latter there was the development of cutaneous appendages in the center of the scar (HE,100X).

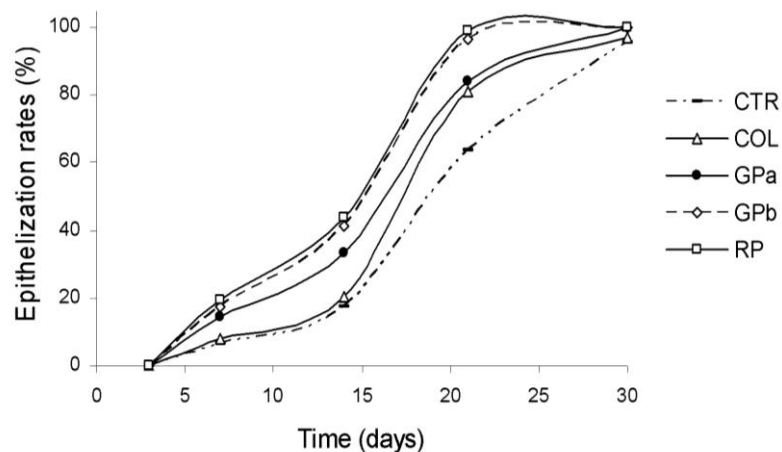


Figure 2. Percentual epithelization rates of the burn wounds along the time. Observe ethat GPa, GPb and RP exhibited higher rates than CTR and COL.

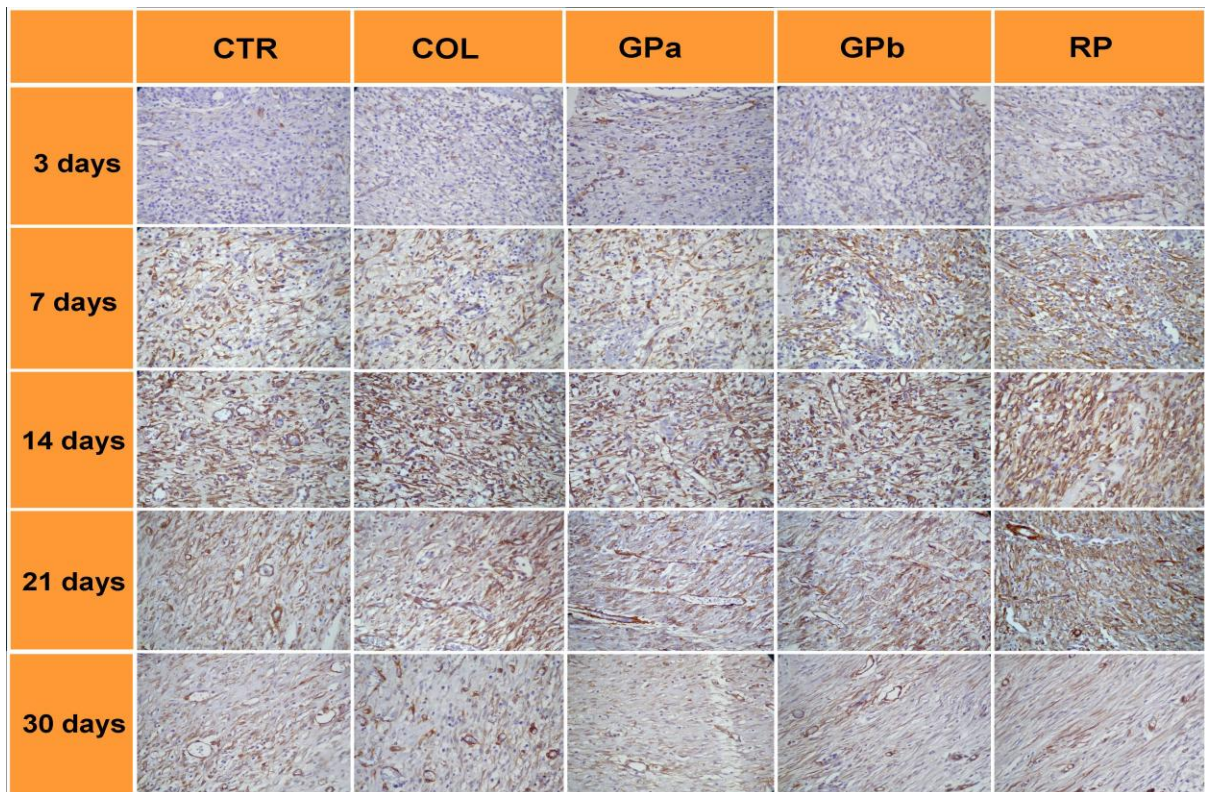


Figure 3. Dynamics of miofiblastic differentiation in burn healing. Whereas a scanty immunomarking was found in the third day in all groups, a remarkable increase in the myofibroblasts differentiation was observed in 7 and 14 days. Observe that the labeled cells were diffusely arranged within the burn wounds. In 21 days, there was a strong tendency to a parallel arrangement of the myofibroblasts. In 30 days, a clear decrease in the count of immunostained cells was verified in all groups (Immunohistochemical stain Clone 1A4, LSAB, 200x).

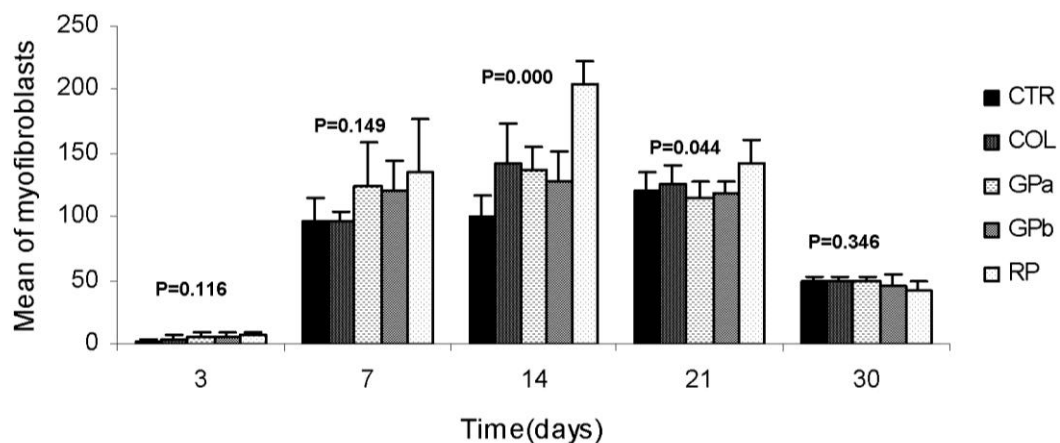


Figure 4. Quantitative assessment of the mean of myofibroblasts count in the experimental groups along the time.

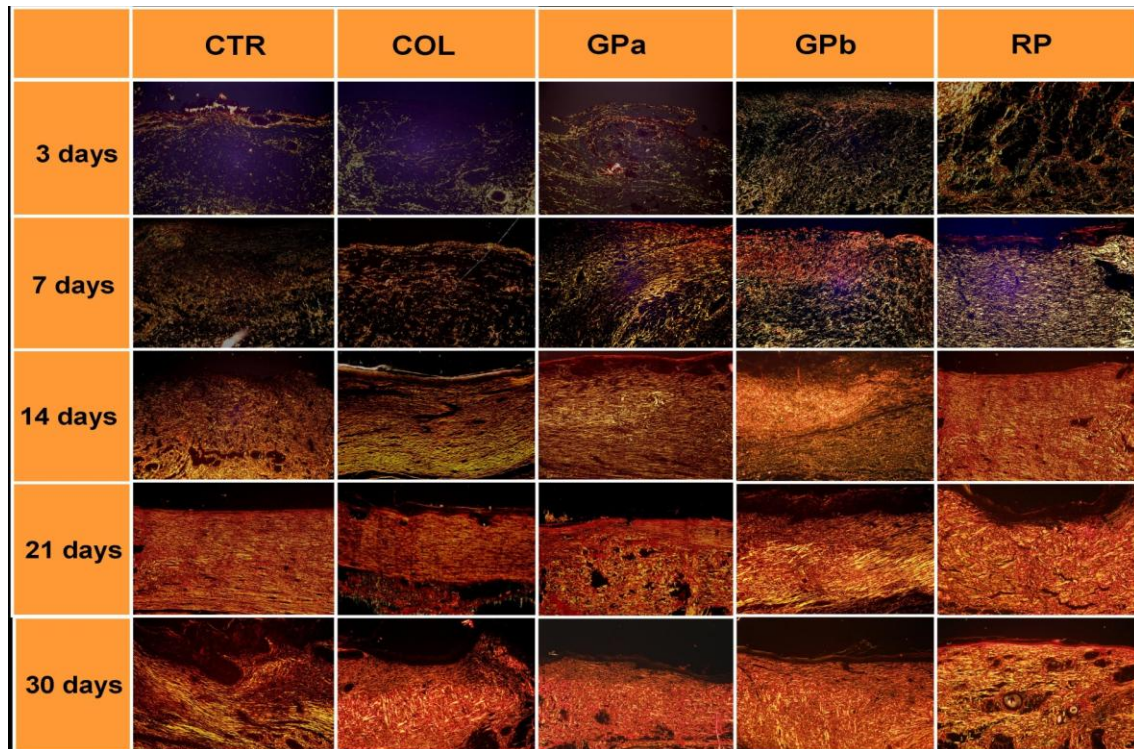


Figure 5. Dynamics of collagen deposition in the burn wounds. Observe the gradative replacement of the reticularly arranged type-III collagen (greenish) for the type – I collagen (orange), initially in a parallel arrangement and subsequently interlacedly disposed, along the time. Note the architectural appearance of the collagenization pattern resembling the normal dermis in RP in 30 days (Sirius red/polarized light, 100x).