

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS BIOATIVAS DE
COLÁGENO QUIMICAMENTE MODIFICADO CONTENDO
PRÓPOLIS VERMELHA PARA APLICAÇÃO EM
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ABERTAS**

ISANA CARLA LEAL SOUZA

ARACAJU
Março – 2013

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS BIOATIVAS DE
COLÁGENO QUIMICAMENTE MODIFICADO CONTENDO
PRÓPOLIS VERMELHA PARA APLICAÇÃO EM
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ABERTAS**

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.

ISANA CARLA LEAL SOUZA

Orientador (es)

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior, D.Sc.

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.

ARACAJU

Março – 2013

OS AUTORES PERMITEM A REPRODUÇÃO DE CÓPIAS OU PARTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SOMENTE PARA PROPÓSITOS ACADÊMICOS E CIENTÍFICOS DESDE QUE A FONTE SEJA CITADA.

S237a Souza, Isana Carla Leal

Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas. / Isana Carla Leal Souza ; orientadores: Ricardo Luiz Calvacanti de Albuquerque Junior, Juliana Cordeiro Cardoso. – Aracaju, 2013.

106p. : il
Inclui bibliografia.

Dissertação de mestrado (Saúde e Ambiente). – Universidade Tiradentes, 2013

1.Colágeno. 2. Modificação química. 3.Própolis vermelha. 4. Cicatrização. I. Albuquerque Júnior , Ricardo Luiz Cavalcanti. (orient.) II. Cardoso. Juliana Cordeiro. (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 504:614

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO QUIMICAMENTE
MODIFICADO CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA PARA APLICAÇÃO EM
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ABERTAS**

ISANA CARLA LEAL SOUZA

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:

Ricardo Luiz Cavalcante Albuquerque Júnior, D.Sc.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso, D.Sc.
Orientadora

Edja Maria Melo de Brito, D.Sc.
1º Examinador

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
2º Examinador

Francine Ferreira Padilha, D. Sc.
1º Suplente

José Melquíades de Resende Neto, D. Sc.
2º Suplente

ARACAJU

Março – 2013

*“Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite.
É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.
Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por levarem a poluição.
Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas
finanças evitando desperdício.
Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.
Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que queria ou posso ser grato
por ter nascido.
Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalhado.
Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus.
Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas
amizades.
Se as coisas não saírem como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.
O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser.
E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.
Tudo depende de mim.”*

Charles Chaplin

Dedico este trabalho à minha família, meu porto seguro e refúgio cercado de compreensão e amor verdadeiro.

AGRADECIMENTOS

Findada mais uma etapa, todos os momentos de abdicção, esforço e dedicação vividos ao longo desta trajetória, valeram a pena. Não esquecendo todos aqueles que se fizeram presente, agradeço aqui a pessoas que já eram ou se tornaram especiais e fundamentais para a conclusão deste mestrado.

Agradeço a Jeová Deus por ter me concebido saúde, discernimento e paciência.

Ao meu esposo e amigo Leonardo Lordêlo, pelo incentivo e compreensão a mim dedicados, eximindo-se dos seus momentos de lazer para fazer-me companhia ao longo dos finais de semana, feriados e férias restritos há dois anos às jornadas de estudos do mestrado.

Aos meus pais, Francisco Carlos e Ágma, e minha irmã Patrícia, pelo amor incondicional, pelas orações e pelo incentivo. Cada passo que dou em minha vida é orgulho para vocês, e por isso procuro sempre manter integridade e respeito ao próximo para não decepcioná-los.

Às minhas amigas irmãs, Acácia Mérici e Cynthia Faro, pelos momentos de descontração proporcionados em meio aos nossos encontros semanais “obrigatórios”. Ter amigos de verdade se resume em tê-las como amigas.

À Universidade Tiradentes, pelo incentivo em proporcionar aos seus docentes o crescimento profissional.

Ao meu orientador, Professor Ricardo Luiz Cavalcante Albuquerque Júnior por ter confiado em mim no momento em que aceitou orientar-me, pelas exigências e ensinamentos transmitidos para que sempre o melhor fosse realizado.

À minha orientadora, Professora Juliana Cordeiro Cardoso que mesmo distante se dispunha a ajudar e nunca se fez ausente nesta orientação.

Ao Professor Luiz Pereira da Costa por sempre manter-se solícito diante dos pedidos de socorro em explicações sobre as caracterizações das membranas.

À Professora Margarete Zanardo, por acompanhar pacientemente a evolução deste trabalho e contribuir para a sua melhoria por meio das participações em todos os seminários, qualificação e defesa.

Aos alunos Raquel e Ricardo que souberam aproveitar a oportunidade da iniciação científica, e envolveram-se com responsabilidade e presteza neste projeto.

Aos funcionários do Biotério: Gladston, Marcos e Max, por tornarem possíveis os experimentos com ensaio biológico.

A todos os colegas de mestrado pelo convívio maravilhoso, e pelas amizades construídas, em especial à Adriana, Alessa, Ana Célia e Sandra pela afinidade estabelecida e amizades conquistadas. À Rose Nely, Camila, Fanildes, Catharina, e todos os alunos do LMBE, por partilharmos a maior parte dos nossos dias ao longo deste mestrado em parcimônia e presteza.

À parceira de pesquisa Marismar que se tornou uma amiga e sempre esteve disposta a me ajudar. Companheira de experimentos e estudos, nossos caminhos se tornaram os mesmos em meio a dúvidas referentes a técnicas, realização de ensaios biológicos e caracterizações. Que a distância que nos leva para nossa vida após mestrado, não seja suficiente para nos afastar.

Aos meus alunos e colegas de trabalho do Unit Lab, pela compreensão e ajuda nos momentos de ausência. Isso nos faz feliz no ambiente em que trabalhamos.

A todos vocês, muito obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.2 OBJETIVOS	18
CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Processo Cicatricial	20
2.2 Colágeno	26
2.3 Membranas Bioativas	28
2.3.1 Membranas Bioativas de Colágeno	29
2.3.2 Reticulação Polimérica	31
2.3.3 Incorporação de Substâncias em Membranas Bioativas	32
2.4 Própolis	32
2.4.1 Própolis Vermelha	34
CAPITULO II – MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Extração do Colágeno	38
3.2 Modificação do Polímero Utilizando Maltodextrina (CM)	38
3.3 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico da Propolis Vermelha (EHPV)	38
3.4 Desenvolvimento de Membranas Bioativas	39
3.5 Caracterização de Membranas Bioativas	39
3.5.1 Propriedades Mecânicas	39
3.5.2 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	40
3.5.3 Índice de Intumescimento	40
3.6 Ensaio Biológico de Cicatrização	40
3.6.1 Determinação do Índice de Retração Clínica das Feridas	41
3.6.2 Procedimentos Histológicos Histoquímicos	42
3.6.3 Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação Inflamatória (secções coradas em HE)	42
3.6.4 Análise da Deposição Colagênica (secções coradas em Picrossírius)	43

3.7 Análise Estatística	43
CAPITULO III – RESULTADOS	44
4.1 Caracterização das Membranas Bioativas	45
4.1.1 Propriedades Mecânicas	45
4.1.2 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)	46
4.1.3 Índice de Intumescimento	47
4.2 Ensaio Biológico de Cicatrização	49
4.2.1 Determinação do Índice de Retração Clínica das Feridas (IRF)	49
4.2.2 Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação Inflamatória (secções coradas em HE)	50
4.2.3 Análise da Deposição Colagênica (secções coradas em Picrossírius)	52
CAPITULO IV – DISCUSSÃO	54
5.1 Caracterização das Membranas Bioativas	55
5.1.1 Propriedades Mecânicas	55
5.1.2 Permeabilidade ao Vapor de Água	56
5.1.3 Índice de Intumescimento	57
5.2 Ensaio biológicos	58
5.2.1 Determinação do Índice de Retração das Feridas	58
5.2.2 Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação Inflamatória	60
5.2.3 Análise da Deposição Colagênica	62
CAPITULO V – ARTIGO: Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract.	64
CAPITULO VI – CONCLUSÕES	88
CAPITULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

B – SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

LISTA DE TABELAS

		Pg.
Tabela 1	Descrição dos parâmetros para a avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas feridas	43
Tabela 2	Propriedades mecânicas das membranas C (membrana bioativa de colágeno), CM (membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado), CP (membrana bioativa de colágeno contendo EHPV), e CMP (membrana de colágeno quimicamente modificado contendo EHPV). Tensão de ruptura (MPa), deformação ou taxa de alongamento (%) e módulo Young ou módulo de elasticidade (MPa).	46
Tabela 3	Distribuição dos valores médios dos escores (média \pm desvio padrão) atribuídos à semiquantificação da resposta inflamatória nos grupos estudados.	50

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1	47
Permeabilidade ao vapor de água (PVA) das membranas C (membrana bioativa de colágeno), CM (membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado), CP (membrana bioativa de colágeno contendo EHPV), e CMP (membrana de colágeno quimicamente modificado contendo EHPV). Diferentes letras representam valores com diferença significativa ($p < 0,05$).	
Figura 2a	48
Avaliação do Índice de Intumescimento das membranas ao longo do tempo em pH neutro (7,2). (a) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$), CP ($p < 0.05$) e CMP ($p < 0.05$). (b) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$) e CMP ($p < 0.001$). (c) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$). (d) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$). (e) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$).	
Figura 2b	48
Avaliação do Índice de Intumescimento das membranas ao longo do tempo em pH ácido (1,2). (a) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$) e CP ($p < 0.05$). (b) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$) e CMP ($p < 0.05$). (c) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.01$). (d) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.01$). (e) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.01$).	
Figura 3	49
Avaliação dos índices de retração das feridas (IRF) nos grupos experimentais ao longo do tempo do ensaio para avaliação do processo de cicatrização da ferida. CTR (grupo controle – ferida sem cobertura), C (ferida coberta com membrana bioativa de colágeno), CM (ferida coberta com membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado), CP (ferida coberta com membrana bioativa de colágeno contendo EHPV), e CMP (ferida coberta com membrana de colágeno quimicamente modificado contendo EHPV). **CMP é significativamente diferente da CTR ($p < 0,01$). ***CMP é significativamente diferente da CTR ($p < 0,001$).	
Figura 4	52
As secções histológicas dos grupos (áreas feridas), ao longo do tempo do ensaio biológico da cicatrização de feridas. Intenso infiltrado neutrofílico é visto em três dias, e tecido de granulação exuberante em sete dias (notar a presença de material amorfo hialinizado consistente com os restos de membranas à base de colágeno em CP e CMP(*). Em 14 dias, a substituição do tecido de granulação por uma cicatriz fibrosa primária é observada em todos os grupos, em CMP é observado o desenvolvimento de um folículo piloso rudimentar. Em 21 dias, o tecido cicatricial fibroso é mais denso em todos os grupos, ao passo que os folículos pilosos são evidenciado sem CP, e as glândulas sebáceas são vistas em CMP (HE, ampliação de 400x).	

Figura 5 Deposição de colágeno nos grupos experimentais durante o tempo de curso do estudo. Há uma predominância de finas e delicadas fibrilas de colágeno tipo III (birrefringência esverdeada) em três e sete dias, enquanto que fibras de colágeno mais grossas do tipo I são vistas em 14 dias. Fibras de colágeno do tipo I entrelaçados são observados em todos os grupos aos 21 dias (Picrossírius / luz polarizada, aumento de 400x). 53

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS BIOATIVAS DE COLÁGENO QUIMICAMENTE MODIFICADO CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA PARA APLICAÇÃO EM CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS ABERTAS

ISANA CARLA LEAL SOUZA

O uso de membranas bioativas como cobertura para feridas tem demonstrado efeitos satisfatórios no auxílio ao processo cicatricial, entretanto métodos para a modificação química de moléculas destes materiais propõem melhores propriedades de biodegradação, e veiculação de substâncias ativas como a própolis vermelha. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar propriedades físicas e potencial cicatrizante de membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) em roedores. Para o desenvolvimento das membranas, o colágeno foi extraído a partir de tendão bovino, modificado através da reação de Maillard usando a maltodextrina como agente reticulante e incorporado o EHPV á 0,5%. As membranas foram analisadas em relação às propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e índice de intumescimento. Para o ensaio biológico, feridas cirúrgicas foram confeccionadas no dorso de 100 ratos, divididos em cinco grupos (n=20) de acordo com a membrana utilizada onde, (C) – colágeno puro; (CM) – colágeno modificado; (CP) – colágeno puro com EHPV; (CMP) – colágeno modificado contendo EHPV; (CTR) – feridas sem cobertura (controle). Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em 3, 7, 14 e 21 dias e a ferida analisada macroscopicamente e microscopicamente. CMP apresentou menor tensão ($p<0.05$), permeabilidade ($p<0.001$) e índice de intumescimento ($p<0.05$) do que o grupo C. No ensaio biológico, CMP promoveu aumento do índice de retração clínica das feridas em 3 ($p<0.01$), 14 ($p<0.001$) e 21 dias ($p<0.01$) comparado com CTR, e promoveu desenvolvimento precoce do tecido de granulação e formação de apêndices cutâneos, bem como uma melhor organização da deposição de colágeno. Sugere-se que a incorporação do EHPV em membranas de colágeno modificado propiciou melhorias ao processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.

Palavras-chave: Colágeno, modificação química, própolis vermelha, cicatrização

DEVELOPMENT OF BIOACTIVES MEMBRANES OF CHEMICALLY MODIFIED COLLAGEN CONTAINING RED PRÓPOLIS FOR APPLICATION IN HEALING OF WOUNDS

ISANA CARLA LEAL SOUZA

The use as bioactive membrane as dressing for wounds has shown satisfactory effects to aid the healing process, however methods for the chemical modification of molecules comprising these materials have been proposed for improving their biodegradation properties, and serving as the active substances such as red propolis. Therefore, the aim of this study was evaluated the physical properties and healing potential of chemically modified collagen-based membranes containing hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) in rodents. For the development of membranes, collagen extracted from bovine tendon, modified through Maillard's reaction using maltodextrin as reticulant agent and incorporated the EHPV 0.5%. The membranes were evaluated regarding the mechanical properties, water vapor permeability and swelling rates. For the wound healing assay, surgical wounds were performed on the back of 100 rats, assigned into five groups (n=20), whose wounds were dressed as follows: (C) – original membranes; (CM) – modified membranes; (CP) – HERP incorporated original membranes; (CMP) – HERP incorporated modified membranes; (CTR) – undressed wounds (control). Five animals of each group were euthanized at 3, 7, 14 and 21 days and the wounded areas were macroscopic and microscopically analyzed. The CMP-membranes showed lower thickness ($p<0.05$), permeability ($p<0.001$) and swelling ($p<0.05$) than the C-membranes. The CMP-membranes promoted increased wound contraction rates at 3 ($p<0.01$), 14 ($p<0.001$) and 21 days ($p<0.01$) compared to CTR, and provided earlier granulation tissue and cutaneous appendages formation, as well as better organization of the collagen deposition. In conclusion, the CMP-membranes presented advantageous properties to be used as wound dressing and improved wound healing in rodent model.

Key-words: Collagen, chemical modification, red propolis, healing

1. INTRODUÇÃO

O evento dinâmico e complexo que envolve o processo de cicatrização torna o manejo de feridas dérmicas um fator preocupante à saúde uma vez que o tratamento destas perturbações podem gerar altos custos financeiros, resistência a antibióticos, altas taxas de septicemia, incapacidade de restaurar a pele como de início, impacto ao bem estar geral do paciente, podendo até causar a morte quando em danos de grandes proporções (NUNES et al, 2011; SETH et al, 2012).

Quando a perda tecidual é extensa, o processo cicatricial pode não ser suficiente para que ocorra a cura, devendo-se considerar, então, tratamento com enxertos e retalhos. Várias técnicas de substituição tecidual foram introduzidas com o intuito de promoverem a bioestimulação, reduzindo a formação de cicatrizes e acelerando o tempo de cicatrização (HOYAMA et al, 2005) por propiciar proliferação celular e recuperação da pele, sem causar efeitos danosos ao organismo (VINHAS et al, 2007; NUNES et al, 2011; SARGEANT et al, 2012; SETH et al, 2012).

Neste processo de bioestimulação, o uso de membranas bioativas como cobertura para feridas tem mostrado efeitos satisfatórios no auxílio ao processo cicatricial quando produzidas a partir de biomateriais que apresentam características com caráter biodegradável e sustentável (GINDL et al, 2006). Como por exemplo, o colágeno extraído de tendão bovino, o qual tem sido aplicado na fabricação destas membranas, que servem como suporte para crescimento celular, além de veicular fármacos ou liberar outras substâncias com propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante no local da lesão (SIONKOWSKA et al, 2006; ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; RIELLA et al, 2012).

Dentre os tipos de colágeno destaca-se o tipo I, importante constituinte protéico da pele humana, por apresentar excelente aplicabilidade no reparo cicatricial. Suas propriedades bioativas e estruturais já bem elucidadas fazem desta glicoproteína um adjuvante no reparo de feridas dérmicas (NEEL et al, 2012).

Quando aplicadas sobre feridas, as membranas de colágeno podem sofrer ações enzimáticas decorrente da presença de gelatinases e outras proteases, fazendo com que sejam mais rapidamente reabsorvidas pelo organismo (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; WOLF, 2007; LEE et al, 2001). Essa

degradação pode ser prevenida por modificações químicas da molécula através de processos de fabricação, tais como a reticulação química (NEEL et al, 2012).

A reação de Maillard é uma das maneiras de se induzir a modificação química na estrutura da proteína. Essa modificação ocorre pela reação com moléculas de açúcar a grupamentos amino, que aparecem em resíduos de lisina e hidroxilisina do colágeno (CARDOSO, 2005; CARDOSO et al, 2011).

Produtos de origem natural também têm sido incorporados às membranas bioativas com o objetivo de acelerar a recuperação do tecido lesado e evitar contaminação local. A incorporação de substâncias ativas tais como, ácido úsnico e extrato hidroalcolico de própolis vermelha (EHPV) às membranas de colágeno, tem sido proposta, apresentando resultados positivos no processo cicatricial (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; NUNES et al, 2010).

A própolis vermelha produzida no nordeste brasileiro possui propriedades biológicas e composições químicas distintas das diferentes amostras coletadas em várias partes do país (NUNES et al, 2009). Dentre as propriedades demonstradas para esta variedade de própolis citam-se atividades antibacteriana, antiviral, fungicida (SALOMÃO et al, 2007), citotóxica, antiinflamatória, imunomodulatória, antioxidante e antitumoral (BARRETO, 2008; TORRES et al, 2008; ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; CORRÊA, 2011).

Por outro lado, a apicultura no nordeste do país tornou-se uma importante atividade de agronegócios que é hoje conhecido como exportador e produtor de produtos apícolas como a própolis (SANFORD, 2005). Estudos que comprovem os benefícios da própolis vermelha poderão contribuir para a consolidação do arranjo produtivo da apicultura sergipana.

O presente estudo utilizou o EHPV, o qual tem apresentado bom resultado cicatrizante em experimentos (Albuquerque-Júnior et al, 2009), em membrana de colágeno modificado, acompanhando até o 21 dia do processo cicatricial, e tendo suas características mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água e índice de intumescimento analisadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e caracterizar uma membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, com ação bioestimulante no processo de cicatrização dérmica por segunda intenção.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar as propriedades físicas da membrana bioativa de colágeno reticulado com maltodextrina com e sem EHPV, incluindo as propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e índice de intumescimento;
- ✓ Avaliar a ação das membranas bioativas em ensaios biológicos de cicatrização dérmica por segunda intenção, utilizando o índice de retração clínica das feridas, a análise semiquantitativa da intensidade da reação inflamatória e a deposição de colágeno.

Capítulo I – Revisão Bibliográfica

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Processo Cicatricial

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Nos organismos unicelulares, está restrita à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais e de moléculas de alta complexidade como RNAs e o DNA. Em organismos superiores, além destes, também ocorre o reparo de tecidos que pode se dar pela regeneração com a recomposição da atividade funcional ou pela cicatrização com restabelecimento da homeostasia tecidual e da sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MASSENO et al, 2010).

Portanto, a cicatrização é um fenômeno complexo caracterizado por uma sequência de eventos biológicos que envolvem a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular num processo dinâmico e harmônico com o objetivo de garantir a restauração tissular (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; CASTRO et al, 2012).

Na cicatrização após a lesão, são identificadas três fases consecutivas do processo que ocorrem de maneira progressiva, se sobrepondo em determinados momentos, denominadas de exsudativa (ou inflamatória), proliferativa e cicatricial (ou remodeladora) (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010; KONDO e ISHIDA, 2010; ADAMS-JUNIOR; SABESAN; EASLEY, 2012; GATNAU; GONZALO; SANZ, 2012).

A fase exsudativa ou inflamatória se desenvolve logo após o trauma, iniciando-se a partir de um extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. Estas se agregam, e juntamente com a coagulação sanguínea geram um tampão rico em fibrina, capaz de reestabelecer a hemostasia (YOUNG e MCNAUGHT, 2011; GATNAU; GONZALO; SANZ, 2012).

Nesta fase, que acontece por um período de três a cinco segundos, ocorre uma complexa liberação de produtos, dentre eles estão substâncias vasoativas,

proteínas adesivas, proteases e fatores de crescimento, ditando o desencadeamento de outras fases (YOUNG e MCNAUGHT, 2011; GANTWERKER e HOM, 2012).

A adesão inicial das plaquetas à superfície lesada ocorre pelas proteínas de adesão presentes na sua membrana. As principais delas são os receptores da glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). Esses receptores possuem sítios de ligação para o fibrinogênio, fator de von Willebrand, vitronectina, fibronectina e trombospondina. Em seguida, as plaquetas são ativadas por um grande número de substâncias agonistas presentes na matriz subendotelial e na corrente sanguínea (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; GANTWERKER e HOM, 2012).

Embora seja membro da família de receptores das integrinas (responsáveis pela interação e adesão célula-célula), a GP IIb/IIIa possui uma distribuição restrita sendo encontrada apenas nas plaquetas e em outras células de linhagem megacariocítica. É a proteína mais abundante da superfície plaquetária, com aproximadamente 80.000 cópias por plaqueta representando 1 a 2 % de todas as proteínas plaquetárias (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A presença de dor, calor e rubor é característica da fase inflamatória, e a organização provisória da matriz extracelular, necessária para a migração celular, também acontece, funcionando como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (KIM et al, 2012).

Dentre os fatores de crescimento liberados devido à degranulação plaquetária tem-se o derivado de plaquetas (PDGF), o de crescimento transformante β (TGF β), o de crescimento epidérmico (EGF), o de crescimento transformante α (TGF α) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória, inicialmente rica em ácido hialurônico, colágenos tipo I e III, mas tem sua proporção de colágeno tipo III diminuída em relação ao colágeno tipo I com o evoluir do processo cicatricial, aproximando-se assim da derme normal (WERNER e GROSE, 2003; KIM et al, 2012).

No entanto, a fase inflamatória do processo cicatricial também é dependente da presença de leucócitos, como polimorfonucleares e monócitos. Após a saída das plaquetas de dentro do leito vascular, neutrófilos e monócitos, em resposta aos

agentes quimiotáticos, migram em direção ao leito da ferida, formando uma barreira contra a invasão de microrganismos e promovendo o recrutamento de mais células de defesa (MENDONÇA e COUTINHO-NETO, 2009; GATNAU; GONZALO; SANZ, 2012).

Os neutrófilos oriundos da circulação são as primeiras células a alcançarem a região inflamada, sendo os tipos celulares predominantes entre o primeiro e segundo dias (YOUNG e MACNAUGHT, 2011; GANTWERKER e HOM, 2012).

A atividade neutrofílica é acentuada por anticorpos lançados na ferida devido às alterações vasculares, e gradualmente os neutrófilos diminuem em número sendo substituídos por outras células do sistema de defesa, caracterizando-se assim a cronificação do processo (YOUNG e MCNAUGHT, 2011).

Por sua vez, os monócitos do sangue periférico, tanto inicialmente quanto durante o transcorrer do processo cicatricial, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos, como o PDGF. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas, assim como a fagocitose dos componentes celulares, contribui também para a ativação dos monócitos, transformando-os em macrófagos, quando atingem o tecido extravascular (MENDONÇA e COUTINHO-NETO, 2009).

Dando continuidade a atividade fagocitária iniciada pelos neutrófilos, os macrófagos são ativados e infiltram-se no local onde está ocorrendo o evento cicatricial, permanecendo do terceiro ao décimo dia. Estas células são as principais células efetoras do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas, bem como removendo os neutrófilos e excesso de antígeno, dando lugar à proliferação celular (DARBY e HEWITSON, 2007; GANTWERKER e HOM, 2012).

Além de realizar a fagocitose de fragmentos celulares, os macrófagos também secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos. Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- β , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o VEGF, que se destacam como as principais

citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (KONDO e ISHIDA, 2010; KIM et al, 2012).

Em um processo inflamatório de curta duração, se o elemento irritante for eliminado, os macrófagos morrem ou deslocam-se para vasos linfáticos e linfonodos. Entretanto, na inflamação crônica, o acúmulo de macrófagos persiste mediado por diferentes mecanismos e envolvido em processos como angiogênese, migração e proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e contração da ferida no processo cicatricial (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; MONACO e LAWRENCE, 2003).

Com função exata no processo inflamatório ainda obscura, surgem aproximadamente uma semana depois os linfócitos. Existem outros tipos de células presentes no processo inflamatório crônico que são os plasmócitos e eosinófilos, dando início à resposta imune aos antígenos invasores. A duração e intensidade da resposta inflamatória são sinais importantes na avaliação da severidade, morbidade e possíveis fatores que venham interferir na cicatrização (DIGELMANN e EVANS, 2004).

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, a fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Os mastócitos são células também presentes na inflamação aguda e crônica. Secretoras multifuncionais do sistema imune participam regulando a resposta imunológica pela liberação de mediadores químicos como aminas vasoativas dentre elas a histamina, proteoglicano estruturais e citocinas, que contribuem para a fibrose e diferenciação de células T. Desta forma, a relação da população de mastócitos, inflamação e reparo tem sido extensivamente pesquisada na literatura, especialmente em modelo animal (SANTOS et al, 2010).

A fase proliferativa é responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente dita. Esta fase caracteriza-se por uma reepitelização que se inicia horas após a injúria, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem quanto

do apêndice epidérmicos periféricos; fibroplasia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação, responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão (DESCHENE et al, 2012).

A agilidade do processo de reepitelização dependerá da participação de fatores de crescimento. Estes são os prováveis responsáveis pelo aumento da mitose e hiperplasia do epitélio. Desta forma, as células endoteliais se proliferam constituindo cordões sólidos entremeando os fibroblastos que se multiplicam num processo chamado fibroplasia, canalizando-se posteriormente e resultando em tecido de granulação, com aspecto granuloso, avermelhado e pouco consistente (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Os fibroblastos, por sua vez, se movem na ferida ao longo da matriz extracelular produzida pelos mesmos e, após ingressarem nessa matriz, podem assumir três fenótipos: migratório, produtor de colágeno ou contrátil. Não apenas colágeno, mas o fibroblasto produz também elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (DIGELMANN e EVANS, 2004; YOUNG e MACNAUGHT, 2011; ROSE, 2012).

A matriz extracelular do tecido conjuntivo tem papel fundamental nesta fase do reparo formando um complexo de macromoléculas que, não só providencia suporte estrutural para os tecidos, mas também modula várias funções dos componentes celulares, tais como: proliferação, diferenciação, movimentação e junção celular. Esta matriz extracelular será necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (GANTWERKER e HOM, 2012).

Logo após a fibroplasia ocorre angiogênese, essencial à formação do tecido de granulação, suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização. Novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes e na maioria das vezes, ocorre na angiogênese um aumento da permeabilidade vascular (KONDO E ISHIDA, 2010).

Por volta do décimo dia, o leito da ferida está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, com uma rede capilar atravessando-o e, a rede linfática em franca regeneração, devido a sua reconstrução ter início posterior ao da vasculatura.

O tecido de granulação vai sendo enriquecido com mais fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica característica da cicatriz. Nesta etapa, surgem as primeiras fibras de colágeno tipo I. Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparecem observando apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando finalmente a cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Todos esses acontecimentos consistem na última fase do processo de cicatrização, a fase cicatricial. Esta é caracterizada por epitelização da superfície da ferida e contração cicatricial. A contração cicatricial é um movimento centrípeto das bordas da ferida que produz uma diminuição da área lesada e, juntamente com a reepitelização, participa ativamente para o fechamento da ferida (DARBY e HEWITSON, 2007).

A proliferação das células epiteliais ocorre até que haja justaposição dos vários botões epiteliais e formação de camadas subsequentes. A delgada epiderme, formada inicialmente, é frágil em decorrência da ausência das interdigitações entre o epitélio e o conjuntivo subjacente (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009).

Em fase mais tardia, os fibroblastos do tecido de granulação transformam-se em miofibroblastos comportando-se como um tecido contrátil responsivo aos agonistas que estimulam o músculo liso. Ocorre, concomitantemente, reorganização da matriz extracelular, que se transforma de provisória em definitiva, cuja intensidade fenotípica, observada nas cicatrizes, reflete a intensidade dos fenômenos que ocorreram, bem como o grau de equilíbrio ou desequilíbrio entre eles (DIGELMANN e EVANS, 2004; MENDONÇA e COUTINHO-NETO, 2009).

É consenso atualmente, que a resolução completa de uma ferida, somente pode ser considerada depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

2.2 Colágeno

Presente na pele, ossos, dentes, tendões, vasos sanguíneos e cartilagens, o colágeno é uma proteína fibrosa que corresponde a 30% das proteínas totais e 6% em peso de todo o humano. Em combinação com sais de cálcio o colágeno é responsável pela estrutura rígida dos ossos, e em combinação com outra proteína, a elastina, formam estruturas mais flexíveis, as quais são essenciais, por exemplo, para a aorta e os pulmões (LEE; SINGLA; LEE, 2001; TONHI e PLEPIS, 2002).

O termo colágeno existe há muito tempo derivando da palavra grega que significa cola. Definições atuais referem-se ao colágeno como uma proteína de relevante importância na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, atuando como substância fundamental ao preenchimento de lacunas dos tecidos parenquimatosos, e produção de fibras colágenas, elásticas e reticulares (RODRIGUES, 2009), porém a funcionalidade mecânica do colágeno continua sendo uma das funções mais importantes. Esta molécula confere aos tecidos no qual é encontrada flexibilidade e resistência a fraturas. O colágeno também está presente na córnea, mas desta vez, o seu elevado grau de alinhamento e ordenação é a propriedade chave para a mecânica estabelecida (NEEL et al, 2012).

Existem pelo menos 25 tipos distintos de colágeno, onde os tipos I, II e III são os mais abundantes, conhecidos como colágenos intersticiais ou fibrilares. Os tipos IV, V e VI são não fibrilares, sendo encontrados no tecido intersticial e membrana basal. As fibrilas de colágeno do tipo I organizam-se e unidas formam uma fibra mais grossa, a fibra de colágeno propriamente dito, resistente a tensões. Este tipo de colágeno é encontrado predominante em animais de grande porte, especialmente na pele, tendões, ligamentos e ossos onde forças extremas são transmitidas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; MEYER et al, 2007; FATHIMA; RAO; NAIR, 2011).

Os tipos de colágeno formam uma família de proteínas altamente características, encontradas em todos os animais multicelulares. É o componente em maior quantidade de todas as matrizes extracelulares, sendo o principal produto dos fibroblastos. Sua origem a partir dos fibroblastos ocorre por meio da síntese de cadeias polipeptídicas individuais de colágeno tipo I e II conhecidos como moléculas precursoras chamadas procolágeno. Ao sofrerem polimerização, os procolágenos

dão origem às moléculas de colágeno que se organizam para formar as fibras de colágeno (MARTINS; REIS; SILVA, 2003; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

Os fibroblastos por sua vez, são as células mais numerosas do tecido conjuntivo frouxo, apresentando intensa capacidade de síntese, núcleo abundante, e riqueza em retículo endoplasmático rugoso. Estas células não se dividem com frequência em um tecido adulto, e entram em mitose apenas em situações que requerem uma reposição aumentada como sobrecarga funcional ou em resposta a lesões. Sua capacidade em formar proteoglicanas, fibras colágenas reticuladas e elásticas os faz ter importante participação na formação da membrana extracelular (MEC) (MARTINS; REIS; SILVA, 2003; MORISCOT; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2004; VRANA et al, 2007).

Glicoproteínas, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e colágeno são os componentes estruturais mais importantes da MEC, e se organizam no meio extracelular por meio de interações múltiplas com receptores específicos da membrana plasmática, exercendo função estrutural e mecânica (ZAGRIS, 2001).

Colágeno tem tido uma grande representatividade como biomaterial proteico e sua extração a partir de constituintes animais para a fabricação de produtos que auxiliem no estudo de processos cicatriciais tem se tornado crescente (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; YAMAUCHI et al, 2000; SIONKOWSKA et al, 2006).

Estudo de culturas realizado *in vitro* tem demonstrado que o colágeno, sendo um substrato natural para as células, é essencial para mantê-las com sua morfologia e fenótipos normais em cultura oferecendo a elas uma estrutura de suporte biointerativa, a qual guia e estimula apropriada formação tecidual. Desta forma, membranas bioativas à base de colágeno têm sido empregadas para melhorar o reparo cicatricial de danos mecânicos e químicos da derme, com ampla aplicação no campo médico e farmacológico uma vez que promovem a maturação da ferida por fornecerem um suporte para uma transição mais rápida à produção do colágeno maduro e seu alinhamento. (ALBUQUERQUE-JUNIOR et al, 2009; GOPINATH et al, 2004).

O colágeno e seus produtos de degradação são quimicamente atrativos para vários tipos de células, possuindo assim um papel bem delineado na cicatrização de

feridas, com propriedades biológicas e hemostáticas capazes de lhe conferirem características de polímero biocompatível, atóxico, imunogênico, biodegradável e de alta resistência à tensão. O colágeno é um polímero com estrutura, propriedades físicas, químicas e imunológicas bem elucidadas. Particularmente, o colágeno tipo I, dentre todos é o mais conhecido e estudado acerca da sua utilização como biomaterial (LEE et al, 2001; ROTHAMEL et al, 2005; TONHI e PEPLIS, 2002).

Para a sua utilização como biomaterial, o colágeno tem sido processado de inúmeras formas tais como, tubos, folhas, esponjas, filmes, pós, soluções injetáveis e dispersões, formando sistemas de liberação de fármacos e funcionando como um substrato para a hemostasia e quimiotaxia de elementos celulares envolvidos no processo de cicatrização, e ainda como material para o revestimento de queimaduras e outras lesões, e como suporte para crescimento de terminais nervosos periféricos danificados (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998; NUNES et al, 2010).

2.3 Membranas Bioativas

A necessidade de buscar estratégias para a aceleração do processo de cicatrização de feridas tem tornado crescente os estudos em torno da utilização de materiais que propiciem os mecanismos de proliferação celular e melhores condições para a recuperação da pele; e neste âmbito a engenharia tecidual tem feito enormes progressos, com a utilização de materiais produzidos a partir de polímeros naturais ou sintéticos (GINDL et al, 2006; NEEL et al, 2012; SARGEANT et al, 2012).

Estes produtos de engenharia tecidual abrangem um grupo heterogêneo de produtos destinados a substituir, de forma temporária ou permanentemente, a forma e a função da pele perdidos (NEEL et al, 2012). As membranas bioativas vêm suprimindo a crescente demanda de materiais com caráter renovável, biodegradável e sustentável, sendo cada vez mais importantes para esse segmento, satisfazendo também as exigências de um curativo ideal (GIRARDI, 2005; GINDL et al, 2006).

O termo biomaterial pode ser aplicado a qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que seja farmacologicamente inerte e

tenha aplicação orgânica, desenvolvida para ser implantada e/ou incorporada em um período de tempo, podendo servir ou não como matriz, veículo, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido, onde houve perda de matéria viva ou de sua função (GIRARDI, 2005).

Um conjunto de requisitos deve ser encontrado em um material para que o mesmo seja considerado um biomaterial. Estes requisitos envolvem o estudo do efeito do ambiente orgânico no material (corrosão, degradação) e o efeito do material no organismo, associando a ele a chamada biocompatibilidade. Um dos grandes objetivos de bioengenheiros e cientistas é a produção de biomateriais biodegradáveis que poderão então ser capazes de substituir tecidos danificados por certo período de tempo durante o qual o processo de reparo natural da área afetada estaria sendo promovido (PEREIRA; VASCONCELOS; ORÉFICE, 1999).

A primeira geração de membranas bioativas apresentavam vários inconvenientes tal como a presença de material não reabsorvível como politetrafluoretileno expandido, o que poderia tornar necessário uma segunda cirurgia para recuperar a barreira até o processo final de cicatrização, além de expor o tecido ao meio externo contribuindo para a colonização bacteriana (ROTHAMEL et al, 2005).

2.3.1 Membranas Bioativas de Colágeno

Colágeno tem demonstrado ser superior a outros materiais utilizados para a construção de membranas bioativas por ser um importante componente do tecido conjuntivo, ter bom desempenho na formação do coágulo, responder à quimiotaxia e ter facilidade de associação com outros compostos ativos (CHIRITA, 2008).

A matriz extracelular garante papel fundamental no equilíbrio estrutural e funcional de um tecido, e sendo o colágeno o principal constituinte desta matriz, os estudos são crescentes quanto a sua utilização na construção de membranas bioativas. Isso por que para uso clínico destes materiais à base de colágeno, é importante conservar a maior parte da composição e da estrutura da matriz extracelular, sem os efeitos adversos para o paciente (VRANA et al, 2007; NEEL et al, 2012; SARGEANT et al, 2012).

As fontes mais utilizadas para se obter o colágeno é de origem porcina ou bovina, podendo ser isolado do intestino delgado, bexiga, fígado, pele, músculo esquelético, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos, nervos, tendões e ligamentos. O processo de obtenção do colágeno a partir da fonte requerida envolvem processos bioquímicos, mecânicos e físicos, sempre buscando preservar a integridade mecânica, a composição e atividade biológica da molécula (MONTROY et al, 2010; NEEL et al, 2012).

Pesquisas com o uso de membranas bioativas como curativos tem proporcionado bons resultados quanto a membranas que tragam benefícios à reconstituição do tecido lesado por prevenir a desidratação do tecido e consequente morte celular; acelerar a angiogênese; induzir a epitelização e a formação do tecido de granulação; facilitar a remoção de tecido necrótico e fibrina; servir como barreira protetora contra microorganismo; promover a diminuição da dor; evitar a perda excessiva de líquidos; e evitar traumas na troca do curativo. Entretanto os estudos avançam, pois a pele é um órgão muito mais complexo do que uma simples membrana permeável cobrindo a superfície do nosso corpo (FRANCO e GONÇALVES, 2008; NEEL et al, 2012).

Os benefícios do uso de membranas de colágeno como curativos temporários para feridas se deve ao fato deste material funcionar como uma barreira física efetiva no local da lesão, prevenindo a perda de fluidos e proteínas, evitando a invasão de bactérias, e conferindo à pele uma cicatrização normal (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

Com ampla aplicabilidade no campo da cicatrização de feridas, o colágeno tem se mostrado um importante biomaterial (FATHIMA; RAO; NAIR, 2011), entretanto as membranas de colágeno puro podem apresentar limitações decorrentes de sua baixa força mecânica, fraca barreira ao vapor d'água, alta solubilidade em água e rápida biodegradabilidade. Quando aplicadas sobre feridas, as membranas de colágeno podem sofrer ações enzimáticas decorrente da presença de gelatinases e outras proteases, fazendo com que sejam mais rapidamente reabsorvidas pelo organismo (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; WOLF, 2007; LEE et al, 2001). Essa degradação pode ser prevenida por

modificações químicas da molécula através de processos de fabricação, tais como a reticulação química (NEEL et al, 2012).

2.3.2 Reticulação Polimérica

A fim de diminuir a velocidade de biodegradação e diminuir as desvantagens referentes ao uso de membranas de colágeno, várias técnicas de reticulação química e enzimática tem sido usadas, tais como reticulação com glutaraldeído e luz ultravioleta, introdução de radicais epoxi, grupamentos acila e polissacarídeos na molécula de proteína, mostrando resultados que apontam para a degradação de membranas reticuladas mais lenta quando comparada a membranas não reticuladas (LEE; SINGLA; LEE, 2001; CARDOSO, 2005; BEKER et al, 2009; GROVER et al, 2012).

Materiais à base de colágeno mostram-se solúveis em água e com pobres propriedades mecânicas após fabricação, porém esses e outros polímeros naturais, são moléculas passíveis a reações por ligações de conjugação, reticulação e outras modificações que podem torná-los mais adaptáveis a aplicações clínicas (FATHIMA; RAO; NAIR, 2011). Com resultados positivos, Yamuch et al (2001), realizaram estudos a partir da modificação química de moléculas de colágeno a fim de diminuir a solubilidade de membranas bioativas em meio aquoso; e Sionkowska et al (2010), utilizaram a reticulação química e térmica de moléculas de colágeno e elastina para a produção de membranas com propriedades estruturais melhoradas.

Modificações em moléculas de proteínas podem ocorrer pela reação das mesmas com moléculas de açúcares redutores. À esta reação dá-se o nome de reação de Maillard, que ocorre entre grupamentos amino e açúcares redutores, em baixa energia de ativação. Grupamentos amino aparecem em resíduos de lisina e hidroxilisina do colágeno (KWAK e LIM, 2004; AJANDOUZ et al, 2008; SHIBAO e BASTOS, 2011).

Por meio de ligações covalentes moléculas de proteínas se polimerizam quando se ligam à moléculas de açúcar, diminuindo a solubilidade do polímero resultante desta ligação e melhorando a capacidade de retenção de água (KARAKISAWA et al, 2012).

A partir da reação de Maillard pode-se produzir material capaz de formar gel, com características de baixa solubilidade em solventes, aumento do grau de intumescimento, o que conseqüentemente pode modificar sistemas de liberação de fármacos. Neste sentido, a incorporação e veiculação de substâncias com ações farmacológicas por meio de membranas bioativas poderão ser satisfatórias (CARDOSO, 2005; CARDOSO et al, 2011).

Em estudo que avaliou o efeito da reação de Maillard em propriedades de caseína e membranas de caseína, Cardoso et al (2011) observaram que as membranas analisadas apresentaram-se mais plásticas, hidrofílicas e sensíveis à erosão em meio ácido, sugerindo então que as modificações geraram um novo polímero.

2.3.3 Incorporação de Substâncias em Membranas Bioativas

A introdução de substâncias ativas em membranas pode agregar maior funcionalidade às mesmas de acordo com as atividades apresentadas por estas substâncias.

Nunes et al (2010), estudaram a incorporação do ácido úsnico à membrana de colágeno. Neste estudo foi observada a dispersão molecular de lipossomas contendo ácido úsnico e solubilização da substância na membrana de colágeno. Albuquerque-Júnior et al (2009), verificaram positivamente o efeito da própolis vermelha vinculada à membranas bioativas de colágeno no processo de cicatrização de segunda intenção. Corrêa (2011) estudou a utilização de membranas à base de pectina contendo extrato de própolis vermelha para o recobrimento de sementes de girassol.

2.4 Própolis

A própolis tem sido empregada pelas suas diversas atividades farmacológicas já constatadas cientificamente. O uso da própolis como tratamento terapêutico natural vem de mais de 5000 anos, em muitas partes do mundo e seu emprego já

era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (MANARA et al,1999; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO-NETO, 2002; SFORCIN e BANKOVA, 2011).

A composição química da própolis é variada, sendo que já foram identificadas mais de 300 substâncias em própolis de diferentes localidades, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas (B₁, B₂, B₃ e B₆) e minerais como Fe (ferro) e Zn (zinco). Dentre estas classes de substâncias, destacam-se a dos flavonóides e a dos ácidos fenólicos, pois é atribuída a elas grande parte das atividades biológicas constatadas para a própolis (FUNARI e FERRO, 2006; PASTOR et al, 2010; MENDONÇA et al, 2011).

A literatura científica relata propriedades farmacológicas da própolis de interesse médico-farmacêutico tais como atividades antimicrobiana, antioxidante, antitumoral, cicatrizante, anti-inflamatória, hepatoprotetora, imunoestimuladora, reparadora tissular, anestésica, contra parasitas intestinais e sanguíneos, antimutagênica e contra doenças cardiovasculares e respiratórias. A caracterização de todas estas atividades biológicas associadas à tendência de utilização de produtos naturais tem resultado num aumento da demanda de própolis e produtos contendo própolis (ADELMAN, 2005; FUNARI e FERRO, 2006; SFORCIN e BANKOVA, 2011).

Própolis é um produto constituído por uma mistura de diversas resinas vegetais, produzido pelas abelhas a partir de exsudatos extraídos de brotos e botões florais de diversas plantas, misturados a ceras e secreções salivares das abelhas, usadas por elas para reparar os favos de mel, impedir o crescimento de microorganismos e embalsamar invasores da colmeia (NUNES et al, 2009; TORRES et al, 2008). Sua composição química e propriedades terapêuticas dependem da origem botânica, localização geográfica e procedência, estando diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem (CABRAL et al, 2009; SAWAYA; CUNHA; MARCUCCI, 2011).

As propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de feridas podem estar relacionadas com a atividade antioxidante da própolis. Esta atividade tem sido atribuída aos flavonóides existentes no extrato de própolis. O processo de regeneração é dificultado na presença de radicais livres. A remoção dos mesmos

pelos flavonóides da própolis permitiria que o órgão ou tecido doente pudesse se regenerar normalmente. Sugere-se que as moléculas de flavonoides podem remover estes radicais e, portanto, contribuir com o processo de regeneração (MENEZES, 2005).

Como agente anti-inflamatório, a própolis demonstra inibir a síntese das prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos, auxilia no sistema imune pela formação de atividade fagocitária, estimula a imunidade celular e aumenta os efeitos cicatrizantes nos tecidos epiteliais (ROSSI et al, 2002; ORSOLIC e BASIC, 2003).

Menezes (2005) relata o isolamento por alguns pesquisadores de determinados compostos da própolis que apresentam atividade anti-inflamatória e atribuíram a esta propriedade à presença na própolis de compostos tais como o ácido cafeico, a quercetina, a narigenina e o éster fenético. Esta atividade anti-inflamatória seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos que também inibem a geração de óxido nítrico, apontada como um dos fatores responsáveis pela atividade anti-inflamatória da própolis.

2.4.1 Própolis Vermelha

Park et al (2004), classificam a própolis brasileira em 12 variedades de acordo com a região geográfica de origem, composição química e vegetação de onde foi extraída. Porém Dausch et al (2007) e Silva et al (2007), em estudo para caracterização química de uma nova variedade de própolis brasileira, concluíram que a *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como própolis vermelha, é o 13ª tipo de própolis brasileira, complementando-se assim aos 12 tipos classificados por Park et al (2004). De origem do litoral do nordeste brasileiro, esta variedade de própolis é encontrada também no litoral sergipano, demonstrando importantes atividades biológicas (MENDONÇA et al, 2011; MAIA-ARAUJO et al, 2011).

Catorze compostos foram identificados a partir da própolis vermelha, incluindo compostos fenólicos simples, triterpenóides, isoflavonóides (OLDONI et al, 2011), prenilados benzofenonas, e epóxidonaftoquinona (IIO et al, 2012).

Em estudo utilizando própolis vermelha, Albuquerque-Júnior et al (2009), concluíram que o uso de extrato hidroalcoólico de própolis vermelha incorporada a membranas de colágeno exerceu efeitos modulatórios sobre o padrão de resposta inflamatória causando melhorias no processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos, devendo-se esses fatos a resultados de maior infiltração plasmocitária, sugerindo aceleração dos eventos que caracterizam a resposta imunológica; e deposição de colágeno mais maduro, semelhante à pele normal. Entretanto este estudo avaliou o processo de cicatrização apenas até o 14^o dia, e as membranas utilizadas no experimento não tiveram suas propriedades físicas analisadas.

Trusheva et al (2006), estudaram os constituintes bioativos da própolis vermelha brasileira, demonstrando em seus resultados a presença de componentes com significativa atividade antimicrobiana e anti-oxidante.

A atividade antimicrobiana da própolis vermelha também foi percebida em estudo realizado por Bispo-Junior et al (2012), a partir da avaliação das frações do extrato desta própolis. Os resultados demonstraram excelente atividade antimicrobiana das frações do extrato de própolis vermelha principalmente frente a cepas gram-positivas e *Candida albicans*.

Ainda no âmbito da saúde, estudos como o de Fuliang et al (2005) e Iio et al (2012), a partir de extrato de própolis vermelha tem demonstrado múltiplos papéis no metabolismo de regulação do colesterol, tratamento e prevenção de desordens associadas à obesidade (IIO et al, 2010), enquanto que Awale et al (2008), evidenciaram um efeito positivo de componentes do extrato da propolis vermelha contra PANC-1 (linhagem de células do carcinoma pancreático humano) em meio nutrido na concentração de 10 ng /mL.

Existe um crescente empenho na produção e exploração da própolis, gerando interesse global de pesquisas. A justificativa para estes acontecimentos apontam para as várias atividades biológicas, e ao alto valor agregado a este produto natural. A expansão da indústria de própolis vermelha só será possível, de forma segura, com a padronização da matéria-prima, levando-se em conta a diversidade da vegetação regional, a atividade de coleta das diferentes variedades de abelhas e

com o estabelecimento da eficácia e segurança dos produtos obtidos (NUNES et al, 2009).

Devido à grande diversidade da flora brasileira e a adaptação das abelhas *A. melífera*, a apicultura tornou-se uma importante atividade econômica. A predominância da própolis vermelha no litoral alagoano e região sergipana pode contribuir para o desenvolvimento apícola desta região (SANFORD, 2005).

Correia-Oliveira et al (2010), descrevem que os apicultores sergipanos apresentam qualidades que podem favorecer o crescimento desse agronegócio, porém muitos ainda veem esta atividade como complemento a sua renda, disponibilizando pouco tempo para esta atividade, evitando a diversificação da sua produção para não comprometer suas demais atividades.

Por ser a apicultura uma atividade que pode ser desenvolvida por pequenos produtores com um retorno significativo e baixo impacto ao meio ambiente, e ser considerada uma atividade sócio-econômica conservadora das espécies vegetais nativas, possibilitando a utilização permanente desses recursos naturais, o incentivo a estes apicultores se faz necessário.

Capítulo II – Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Extração do Colágeno

O colágeno foi extraído segundo método descrito por Albuquerque-Júnior et al (2009), a partir de tendão bovino que foi cortado em pedaços de aproximadamente 1cm e tratado com acetona para remoção do material gorduroso. Posteriormente, 5 g do tendão foram lavados com água destilada e colocados em solução de NaCl 10% (m/V) durante 24 h à temperatura de 4 °C. Após esse período, o tendão foi novamente lavado com água destilada e colocado em solução de tampão citrato 0,02 mol/L pH 4,3 durante 48 h em temperatura ambiente, para o intumescimento do tecido. O tecido intumescido foi homogeneizado em 500 mL de uma solução de ácido acético 0,5 mol.L⁻¹, na presença de pepsina na proporção de 1:50 (m:m) em relação a massa inicial do material. O gel formado foi mantido por 24 h a 4°C. Após esse período, a proteína foi precipitada por *salting out* (separação de proteínas em concentrações elevadas de sal) adicionando ao gel 5% de NaCl (m/V). O colágeno precipitado foi dialisado durante 72 h contra água destilada.

3.2 Modificação do Polímero Utilizando Maltodextrina (CM)

A modificação do polímero foi realizada através da reação do colágeno com um polissacarídeo (maltodextrina (Nidex[®])). O colágeno foi colocado para reagir com 250 mL de solução de maltodextrina a 3%, em temperatura ambiente por 30 dias (CARDOSO, 2005) em quantidade suficiente para ficar totalmente imersa. Para conservação do sistema, foi adicionado 0,2% de metilparabeno. Após este período, o material foi dialisado.

3.3 Obtenção do Extrato Hidroalcólico da Própolis Vermelha (EHPV)

A amostra da própolis vermelha oriunda da região de Brejo Grande/SE/Brasil (10° 25' 28" S 36° 27' 44" O) foi previamente triturada e homogeneizada. A extração foi realizada empregando-se o método de maceração. A maceração ocorreu

utilizando 10 g do material pulverizado em 1000 mL de álcool etílico 70% durante 24 h, a temperatura ambiente com agitação constante. Após o período de extração, o álcool foi evaporado obtendo-se assim o extrato seco.

3.4 Desenvolvimento de Membranas Bioativas

Para a obtenção das membranas bioativas, o colágeno (C) e o colágeno modificado (CM) foram dispersos em ácido acético 0,5 mol.L⁻¹. A concentração polimérica final foi de 1%. O extrato de própolis vermelha foi solubilizado previamente em propilenoglicol (agente plastificante) e adicionado à dispersão de colágeno. A concentração de plastificante e EHPV foram de 20% e 0,5% respectivamente em relação à massa do polímero. As membranas foram produzidas por *casting process* (desidratação de uma solução filmogênica), sendo a dispersão vertida em placa de polipropileno para permitir a evaporação do solvente em estufa à 40 °C. Foram produzidas membranas com e sem EHPV.

3.5 Caracterização de Membranas Bioativas

3.5.1 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas foram determinadas com o uso de um texturômetro, no modo tração (TA-TX2, Stable Micro Systems, England). As amostras foram cortadas em forma retangular (25 x 10 mm), sendo utilizados 10 corpos de prova para cada amostra. A espessura das amostras foi determinada no ponto central com o uso de um micrômetro digital (Micrômetro externo digital, Pantec, precisão ± 0,001 mm). O módulo de Young ou de elasticidade (E) foi calculado a partir da região linear da curva de tensão x deformação, entre 0,00 e 1,00% de alongamento. A resistência (tensão de ruptura e alongamento) do material foi calculada através da área abaixo da curva de tensão x deformação. A separação das garras foi de 10 mm e a velocidade dos testes de 1 mm/s (RIGO, 2006).

3.5.2 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A permeabilidade das membranas foi determinada utilizando um método gravimétrico. A membrana bioativa foi utilizada para selar um recipiente contendo solução saturada de KBr, o qual gera um ambiente com umidade relativa de 84%. Este sistema foi pesado e colocado em um dessecador contendo sílica. A perda de massa referente à permeação do vapor d'água através da membrana foi determinada por pesagens sucessivas a cada duas horas. Cada experimento foi realizado com cinco repetições, durante 48 h. A permeabilidade foi calculada utilizando a equação: $WVP = (w. e) / (t. A. \Delta PV)$, na qual *WVP* é a permeabilidade de vapor de água, *w* é a massa perdida, *e* é espessura do filme, *t* é o tempo, *A* é a área da membrana e ΔPV é a diferença entre a pressão de vapor de água dentro e fora do recipiente.

3.5.3 Índice de Intumescimento

A razão de intumescimento das membranas bioativas foi determinada utilizando amostras das membranas com o tamanho de 2x3 cm em triplicata. As amostras foram pesadas previamente e depois foram imersas em recipientes contendo soluções tampão pH 7,2 ou 1,2. Em tempos de zero, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos, a massa destas membranas foi obtida utilizando balança analítica (SHIMADZU AY220, precisão 0,0001g). Antes de cada pesagem foi removido com papel absorvente o excesso de solução presente nas amostras e a manipulação das membranas nesta análise foi conduzida com o auxílio de pinças. O cálculo da razão de intumescimento foi realizado utilizando a seguinte equação: $\%I = Ma \times 100 / Ms$, na qual $\%I$ é a porcentagem de intumescimento, *Ma* é a massa de água absorvida e *Ms* é a massa da membrana seca.

3.6 Ensaio Biológico de Cicatrização

Para o procedimento cirúrgico foi utilizado um total de 100 ratos machos Wistar (300 a 350 g) mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas

diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22 °C, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil). A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção intraperitoneal de 0,1 mL/100 g de peso de uma solução composta por 1 mL de quetamina (50 mg) e 1 mL de xilazina (20 mg). O dorso dos animais foi tricotomizado e a antissepsia foi efetuada com iodopovidona tópico a 1%. Foram então realizadas com auxílio de um bisturi estéril, feridas cirúrgicas padronizadas com dimensões de 1cm². Não foram realizadas sutura das feridas. Após o término do ato operatório, os animais receberam diclofenaco de potássio na dose de 10 mg/kg, por via intramuscular, com finalidade minimizar a sintomatologia pós-operatória. Os animais foram então subdivididos nos seguintes grupos (n=20): CTR – feridas sem cobertura; C – feridas cobertas com membrana de colágeno; CM – feridas cobertas com membrana de colágeno quimicamente modificado; CP – feridas cobertas com membrana de colágeno contendo extrato de própolis vermelha a 0,5%. CMP – feridas cobertas com membrana de colágeno quimicamente modificado contendo extrato de própolis vermelha a 0,5%. Após 3, 7, 14 e 21 dias a partir dos procedimentos cirúrgicos, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono (modelo CGSCO2G –Beiramar), onde receberam um fluxo de ar contendo 100% de CO₂, durante 10 minutos. Constatada a morte dos animais, foi realizada a remoção dos espécimes equivalentes a área cicatricial com margens de 3,0 mm. Os espécimes removidos foram acondicionados em frascos plásticos contendo solução de formol (10%, pH 7,4) e fixados por 48 h.

3.6.1 Determinação do Índice de Retração Clínica das Feridas

As feridas foram mensuradas nos dias 0 (imediatamente após a cirurgia), 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório (imediatamente após a eutanásia), com o auxílio de paquímetro digital. A partir das medidas das bordas da ferida, padronizada na face lateral direita e borda inferior, obtendo o valor de sua área, sendo avaliada a contração da ferida através da seguinte fórmula: (área inicial - área do dia da

medida) ÷ área inicial x 100 = percentual da contração no dia da medida (TEO; NAYLOR, 2002).

3.6.2 Procedimentos Histológicos Histoquímicos

Decorrido o período de 48 h para a fixação, as peças foram seccionadas transversalmente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina sob a forma de blocos. Os blocos foram montados no micrótomo e obtidos cortes com 5 µm de espessura e, a seguir, submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE) e Picrossírius.

3.6.3 Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação Inflamatória (secções coradas em HE)

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. A intensidade do processo inflamatório foi observada e determinada de acordo com os seguintes critérios: (crônica) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem menos de 10% da população celular observada na área da ferida cirúrgica; (subaguda) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem entre 10% a 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica. (aguda) – quando as células inflamatórias, independente de seu fenótipo, constituírem mais de 50% da população celular observada na área da ferida cirúrgica.

A tipagem da reação inflamatória foi determinada considerando-se a análise semi-quantitativa das diferentes células inflamatórias de acordo com os critérios descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos parâmetros para a avaliação histológica da intensidade da resposta inflamatória nas áreas das feridas.

Escore da resposta inflamatória	Semiquantificação da resposta inflamatória	Classificação da resposta inflamatória
0	Ausente	Ausente
1	Leve	
2	Moderada	Crônica (predominância de linfócitos e histiócitos)
3	Intensa	
4	Intensa	Subaguda (equilíbrio de neutrófilos, linfócitos e histiócitos)
5	Intensa	Aguda (predominância de linfócitos)

3.6.4 Análise da Deposição Colagênica (secções coradas em Picrossírius)

Para a avaliação da deposição de colágeno, cortes histológicos corados em Picrossírius e analisadas sob luz polarizada foram utilizados para a análise descritiva. As fibras de colágeno foram analisadas segundo o seu padrão de birrefringência (esverdeado / amarelo-esverdeada ou laranja, laranja-avermelhada), a aparência morfológica (ondulado ou estirado, delgado ou espesso, curto ou longo), e o arranjo arquitetônico (reticular, paralelo ou entrelaçados) (Rich, Whitaker, 2005).

3.7 Análise Estatística

Os valores médios obtidos a partir da análise para caracterização das membrana bioativas, bem como da análise quantitativa do diâmetro das feridas foram comparados entre os grupos experimentais prefixando-se o nível de significância em 95% ($p < 0.05$). Foi aplicado o teste ANOVA seguido de Tukey para verificar existência de diferenças estatisticamente significante entre os grupos. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis também foi utilizado para a análise semiquantitativa da intensidade da reação inflamatória.

Capítulo III – RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização das Membranas Bioativas

4.1.1 Propriedades Mecânicas

A avaliação das propriedades mecânicas de materiais é útil na identificação e caracterização de membranas bioativas, pois expressam a resistência das mesmas ao alongamento e ao rompimento quando submetidas à tração (RIGO, 2006). Entretanto estas propriedades mecânicas dependem das interações entre os componentes das membranas, ou seja, da formação de ligações moleculares fortes ou numerosas entre as cadeias (RIGO, 2006; ROCHA, 2009).

Os valores que expressam as propriedades mecânicas dos filmes estudados apresentam a espessura média das amostras analisadas, força impressa no momento da fratura (Tensão), as deformações reversíveis ou irreversíveis (Taxa de Alongamento) e a rigidez da membrana (Módulo Young).

Em relação à espessura das membranas (Tabela 2), pode ser observado que todos os grupos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que C apresentou-se mais espesso. A modificação do polímero (CM) proporcionou membranas menos espessas que C ($p = 0,0001$). A introdução do extrato de própolis em CP ($p = 0,003$ comparando com C) e CMP ($p = 0,029$ comparando com CM) também reduziu a espessura das mesmas.

Em relação à tensão máxima para o rompimento das membranas, foi observado que as membranas produzidas com C e CM obtiveram resultados estatisticamente semelhantes ($p = 0,210$). Da mesma forma, a introdução do EHPV nas membranas C também não influenciou a tensão ($p = 0,068$). Entretanto quando EHPV foi incorporado em membranas de CM houve uma diminuição significativa na tensão.

A modificação do colágeno alterou características da medida de alongamento, deixando CM menos deformável que C ($p = 0,033$). Entretanto, a incorporação de EHPV não alterou os valores desta medida quando comparados C com CP ($p = 0,089$) e CM com CMP ($p = 0,853$).

No módulo de elasticidade ou módulo de Young, apenas a membrana CM apresentou aumento significativo em relação aos demais se mostrando, portanto mais rígida. A incorporação de EHPV não influenciou este parâmetro.

Tabela 2. Propriedades mecânicas das membranas C (membrana bioativa de colágeno), CM (membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado), CP (membrana bioativa de colágeno contendo EHPV), e CMP (membrana de colágeno quimicamente modificado contendo EHPV). Tensão de ruptura (MPa), deformação ou taxa de alongamento (%) e módulo Young ou módulo de elasticidade (MPa).

Membranas Bioativas	Espessura (μm)	Deformação (%)	Tensão (MPa)	Módulo de elasticidade (MPa)
C	38,9 \pm 5,9 ^a	3,7 \pm 1,5 ^{a,c}	47,3 \pm 16,6 ^{a,b}	1308,8 \pm 232,0 ^a
CM	22,2 \pm 1,0 ^b	2,1 \pm 1,5 ^b	36,7 \pm 16,9 ^b	1972,7 \pm 664,8 ^b
CP	28,1 \pm 1,2 ^c	6,4 \pm 2,8 ^a	75,6 \pm 25,5 ^a	1232,2 \pm 263,7 ^a
CMP	19,3 \pm 2,0 ^d	2,0 \pm 1,0 ^{b,c}	17,9 \pm 5,9 ^c	1010,6 \pm 368,4 ^a

Diferentes letras na mesma coluna representam valores com diferença significativa ($p < 0,05$).

4.1.2 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

Os resultados dos testes de PVA de membranas bioativas a base de colágeno e colágeno modificado, com e sem adição de EHPV são apresentados na Figura 1. É possível notar que a modificação do colágeno (CM), bem como a incorporação do EHPV (CP) gerou membranas com menor permeabilidade ao vapor de água quando comparados à membrana de colágeno puro (C) ($p < 0,001$). Porém, a incorporação de EHPV em membranas de colágeno modificado (CMP) não apresentou diferença significativa na permeabilidade das membranas quando comparado as membranas de colágeno modificado (CM) ($p < 0,05$).

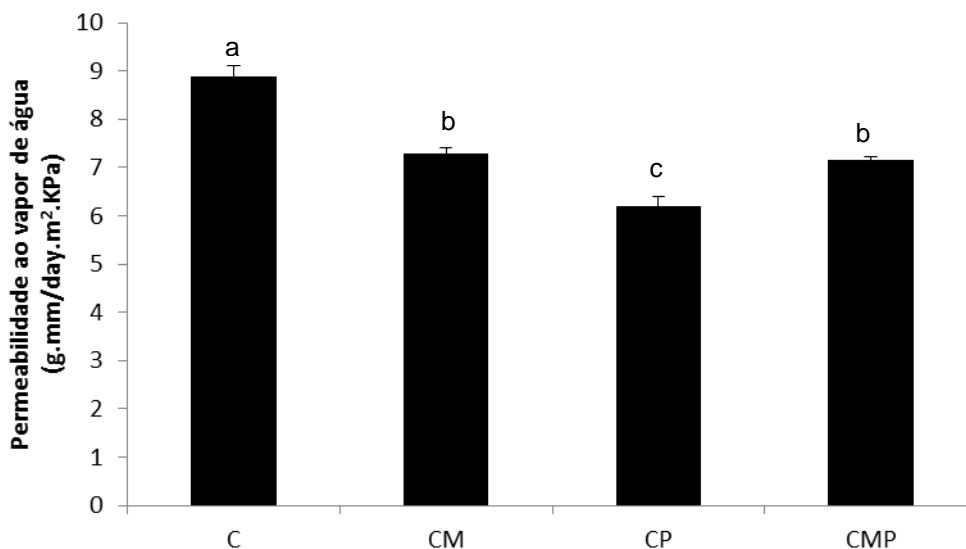


Figura 1. Permeabilidade ao vapor de água (PVA) das membranas C (membrana bioativa de colágeno), CM (membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado), CP (membrana bioativa de colágeno contendo EHPV), e CMP (membrana de colágeno quimicamente modificado contendo EHPV). Diferentes letras representam valores com diferença significativa ($p < 0,05$).

4.1.3 Índice de Intumescimento

A Figura 2 apresenta o comportamento de intumescimento das membranas bioativas quando submetidas a uma solução neutra (tampão fosfato pH 7,2) (Figura 2a) ou ácida (tampão fosfato pH 1,2) (Figura 2b). Nos dois ambientes, a modificação química do colágeno reduziu significativamente o índice de intumescimento das membranas (CM) em todo o curso de tempo da experiência. A incorporação do EHPV aumentou o índice de intumescimento das membranas à base de colágeno nos momentos iniciais experimentais, mas a partir de 1 hora, CP e CMP apresentaram índice de intumescimento semelhantes aos observados em C (membrana de colágeno puro) em ambos os pHs.

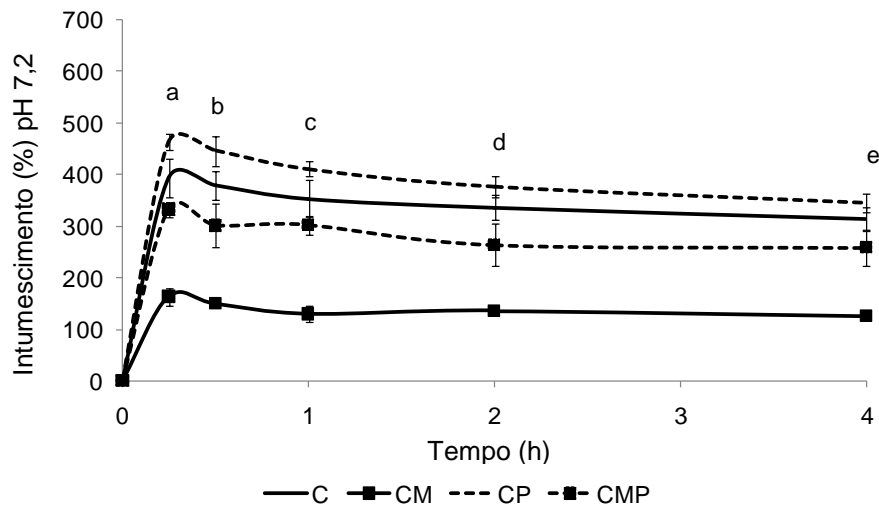


Figura 2a. Avaliação do Índice de Intumescimento das membranas ao longo do tempo em meio neutro (pH 7,2)

- (a) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$), CP ($p < 0.05$) e CMP ($p < 0.05$).
- (b) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$) e CMP ($p < 0.001$).
- (c) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$).
- (d) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$).
- (e) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$).

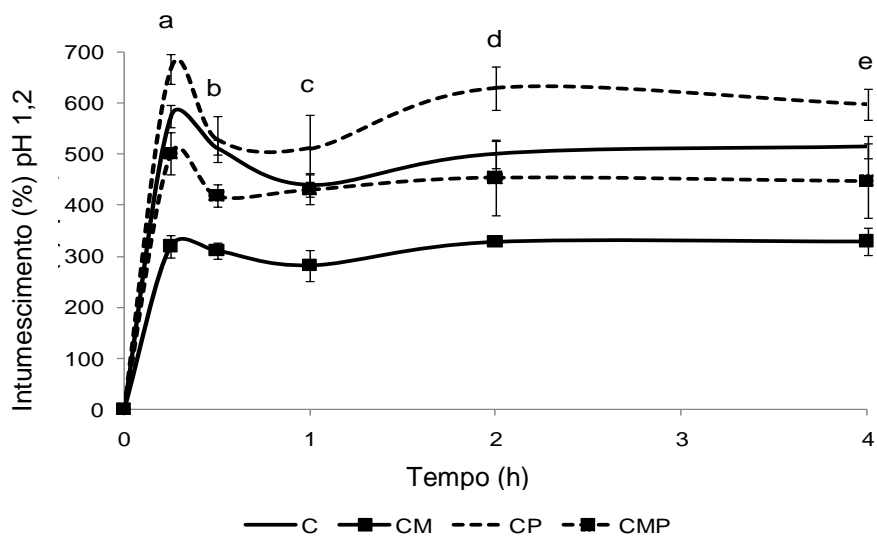


Figura 2b. Avaliação do Índice de Intumescimento das membranas ao longo do tempo em meio ácido (pH 1,2)

- (a) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$) e CP ($p < 0.05$).
- (b) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.001$) e CMP ($p < 0.05$).
- (c) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.01$).
- (d) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.01$).
- (e) C é significativamente diferente de CM ($p < 0.01$).

4.2 Ensaio Biológico de Cicatrização

4.2.1 Determinação do Índice de Retração Clínica das Feridas (IRF)

A avaliação da reparação tissular por meio da observação do percentual de retração da ferida ao longo dos dias preconizados na metodologia deste estudo é demonstrada na Figura 3. A análise dos resultados demonstrou que no 3º dia a retração observada no grupo CMP foi significativamente maior que nos grupos CTR ($p < 0,01$), C ($p < 0,05$) e CM ($p < 0,05$), mas não houve diferença em relação ao grupo CP ($p > 0,05$).

No 7º dia, não houve diferença significativa entre os IRF dos diferentes grupos experimentais ($p = 0,1614$).

No 14º dia, os resultados demonstram uma maior retração no grupo CMP, que foi diferente estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,01$). No 21º dia, a avaliação do comportamento de retração das feridas demonstrou que o grupo controle (CTR) foi diferente de todos os grupos ($p < 0,01$) apresentando em relação a estes uma menor retração da ferida. Pode-se observar ainda no 21º dia que o Grupo CMP foi semelhante apenas aos grupos CP e CM.

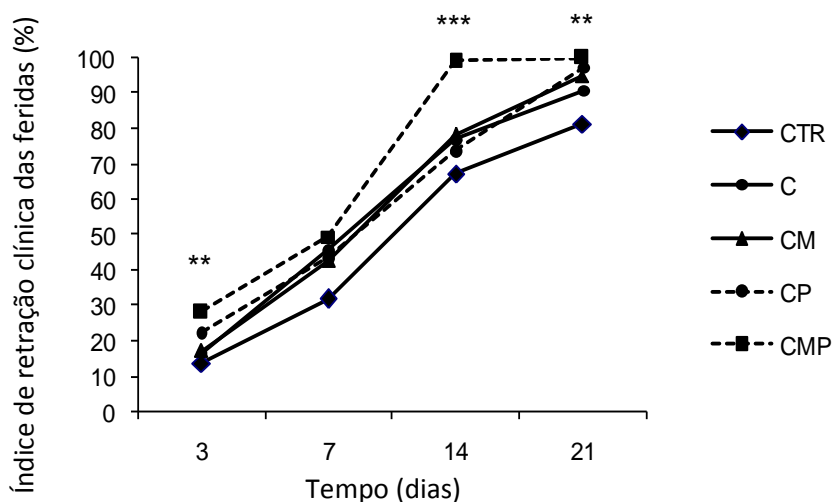


Figura 3: Avaliação dos índices de retração das feridas (IRF) nos grupos experimentais ao longo do tempo do ensaio para avaliação do processo de cicatrização da ferida. CTR (grupo controle – ferida sem cobertura), C (ferida coberta com membrana bioativa de colágeno), CM (ferida coberta com membrana bioativa de colágeno quimicamente modificado), CP (ferida coberta com membrana bioativa de colágeno contendo EHPV), e CMP (ferida coberta com membrana de colágeno quimicamente modificado contendo EHPV). **CMP é significativamente diferente da CTR ($p < 0,01$)
***CMP é significativamente diferente da CTR ($p < 0,001$)

4.2.2 Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação Inflamatória

Conforme pode ser observado na Tabela 3, em três dias, o grupo CP exibiu infiltração significativamente menor de neutrófilos que os grupos CTR ($p < 0,01$), C ($p < 0,01$) e CM ($p < 0,01$), mas não houve diferença quanto a CMP ($p > 0,05$). Não foi evidenciada diferença estatística no escore inflamatório dos grupos em sete dias ($p > 0,05$). Em 14 dias, CM e CMP apresentaram escores inflamatórios significativamente menores que o grupo CTR ($p < 0,05$ e $p < 0,001$), mas não houve diferença entre os grupos tratados com as diferentes membranas de colágeno ($p > 0,05$). Em 21 dias, todos os grupos tratados (C, CM, CP e CMP) exibiram perfis inflamatórios semelhantes ($p > 0,05$), mas significativamente diferentes do grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 3. Distribuição dos valores médios dos escores (média \pm desvio padrão) atribuídos à semiquantificação da resposta inflamatória nos grupos estudados

Tempo	Grupos				
	CTR	C	CM	CP	CMP
3 dias	5,0 \pm 0,0 ^a	5,0 \pm 0,0 ^a	5,0 \pm 0,0 ^a	4,4 \pm 0,54 ^{b,c}	4,6 \pm 0,54 ^{a,c}
7 dias	3,0 \pm 0,0 ^a	3,0 \pm 0,0 ^a	3,0 \pm 0,0 ^a	2,8 \pm 0,44 ^a	3,0 \pm 0,70 ^a
14 dias	2,2 \pm 0,44 ^a	1,4 \pm 0,54 ^{a,b}	1,2 \pm 0,44 ^b	1,4 \pm 0,54 ^{a,b}	0,8 \pm 0,83 ^b
21 dias	1,4 \pm 0,54 ^a	0,4 \pm 0,54 ^b	0,4 \pm 0,54 ^b	0,4 \pm 0,54 ^b	0,4 \pm 0,54 ^b

Letras iguais na mesma linha representam valores com semelhança estatística ($p > 0,05$).

Conforme apresentado na Figura 4, em três dias, foi observada uma intensa infiltração de neutrófilos, particularmente na superfície das feridas (Figura. 4 a – e), associado a edema intersticial hipodérmico. Nos grupos CP e CMP, foi possível evidenciar infiltração linfo-histiocitária mais abundante na profundidade dos espécimes.

Em sete dias, observou-se reação de granulação exuberante em todos os grupos, com marcada proliferação fibro-endotelial e formação de vasos sanguíneos estreitados e irregulares (Figura. 4 f – j). Nos grupos CM e CMP, foi possível

identificar aglomerados de material eosinofílico amorfo compatível com colágeno hialinizado, interpretado como remanescentes dos filmes quimicamente modificados (Figura 4 h/j). Em todos os grupos analisados, o processo de reepitelização se mostrou ainda incipiente, correspondendo a menos de 30% da área superficial das feridas.

Em 14 dias, evidenciou-se a presença de tecido fibroso denso, parcamente vascularizado, e rico em células fusiformes interpretadas como fibroblastos (Figura 4 k-o). Discreta inflamação linfocítica residual ainda podia ser observada, especialmente nos grupos CTR, C e CM. O processo de reepitelização se mostrou bastante avançado, recobrando entre 80 e 100% da área cicatricial em todos os grupos. Em CTR, C, e CM, o tecido epidérmico se apresentou delgado, com interface epitélio-conjuntivo plana, e camada córnea pouco aparente. Nos grupos CP e CMP, a epiderme se mostrou mais espessa, com camada granulosa mais desenvolvida e corneificação mais expressiva. Apenas em CMP foi evidenciada a formação de fâneros cutâneos, particularmente folículos pilosos (Figura 4 o), mais numerosos nas margens da cicatriz.

Em 21 dias, o tecido cicatricial fibroso se mostrou bastante denso em todos os grupos (Figura 4 p-t). O tecido epidérmico se apresentou morfologicamente mais maduro, com camada granulosa e estrato córneo bem desenvolvido. A presença de fâneros cutâneos na área cicatricial só foi observada em CP e CMP (Figura 4 s/t), embora estivessem limitados às regiões marginais no primeiro, e distribuídos em toda extensão da cicatriz fibrosa no segundo.

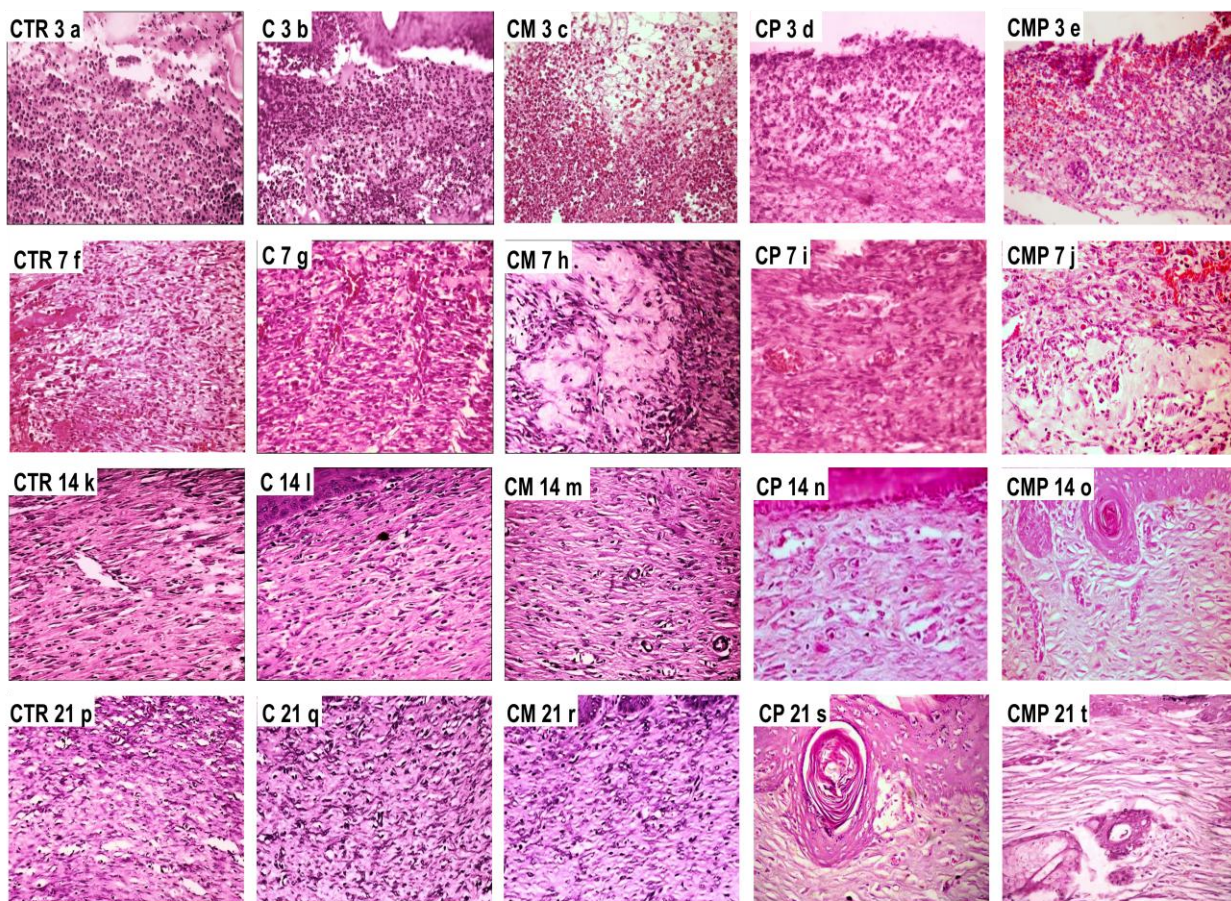


Figura 4. As seções histológicas dos grupos (áreas feridas), ao longo do tempo do ensaio biológico da cicatrização de feridas, onde CTR (grupo controle), sem cobertura; C – membrana de colágeno; CM – membrana de colágeno modificado; CP – membrana de colágeno com EHPV; CMP – membrana de colágeno modificado e com EHPV. Intenso infiltrado neutrofílico é visto em três dias (CTR 3 a; C 3 b; CM 3 c; CP 3 d; CMP 3 e), e tecido de granulação exuberante em sete dias (CTR 7 f; C 7 g; CM 7 h; CP 7 i; CMP 7 j) (notar a presença de material amorfo hialinizado consistente com os restos de membranas à base de colágeno em CP 7 h e CMP 7 j). Em 14 dias (CTR 14 k; C 14 l; CM 14 m; CP 14 n; CMP 14 o), a substituição do tecido de granulação por uma cicatriz fibrosa primária é observada em todos os grupos, em CMP é observado o desenvolvimento de um folículo piloso rudimentar. Em 21 dias (CTR 21 p; C 21 q; CM 21 r; CP 21 s; CMP 21 t), o tecido cicatricial fibroso é mais denso em todos os grupos, ao passo que os folículos pilosos são evidenciado sem CP, e as glândulas sebáceas são vistas em CMP (HE, ampliação de 400x).

4.2.3 Análise da Deposição Colagênica

De acordo com a Figura 5, em três dias, estruturas fibrilares de colágeno tipo III extremamente delicadas e esverdeadas ou amarelo-esverdeadas, com dimensões variadas e disposições reticulares foram observadas em todos os grupos. Em sete dias, as fibras de colágeno tipo III apresentaram-se espessas e densas, concentradas na parte inferior das feridas em CTR, C e CM, mas de forma mais

homogênea em CP e CMP. Em 14 dias, houve substituição do colágeno tipo III por fibras de colágeno tipo I (birrefringência amarela, dourada e vermelha), mostrando fibras curtas, finas, delicadas e dispostas irregularmente em CTR, porém longas e dispostas paralelamente em C, e claramente paralelas nos outros grupos. Além disso, as fibras são mais longas e mais espessas em CP e CMP. Em 21 dias, todos os grupos apresentaram uma cicatriz fibrosa densa, com colágeno disposto em fibras paralelamente e entrelaçadas.



Figura. 5. Deposição de colágeno nos grupos experimentais durante o tempo de curso do estudo onde CTR (grupo controle), sem cobertura; C – membrana de colágeno; CM – membrana de colágeno modificado; CP – membrana de colágeno com EHPV; CMP – membrana de colágeno modificado e com EHPV. Há uma predominância de finas e delicadas fibrilas de colágeno tipo III (birrefringência esverdeada) em três (CTR 3 a; C 3 b; CM 3 c; CP 3 d; CMP 3 e) e sete dias (CTR 7 f; C 7 g; CM 7 h; CP 7 i; CMP 7 j), enquanto que fibras de colágeno mais grossas do tipo I são vistos em 14 dias (CTR 14 k; C 14 l; CM 14 m; CP 14 n; CMP 14 o). Fibras de colágeno do tipo I entrelaçados são observadas em todos os grupos aos 21 dias (CTR 21 p; C 21 q; CM 21 r; CP 21 s; CMP 21 t) (Picrosírius / luz polarizada, aumento de 400x).

Capítulo IV – DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das Membranas Bioativas

5.1.1 Propriedades Mecânicas

Um dos parâmetros que influencia as propriedades das membranas bioativa é a espessura, sendo importante para avaliar a homogeneidade, definir a uniformidade dos materiais, bem como validar as comparações entre as propriedades das membranas (RIGO, 2006; HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

A diferente espessura apresentada entre as membranas caracterizadas neste estudo pode ser associada à observação de Sobral (2000), que estudando a influência da espessura em membranas à base de proteínas miofibrilares sobre as propriedades funcionais das membranas, concluiu que o controle da espessura é muito difícil, pois nos processos de produção do tipo “casting” ocorrem variações principalmente por dificuldades no controle da relação massa/área no suporte e problemas no controle da umidade relativa do ar de secagem.

Porém em estudo de membranas biodegradáveis produzidas a partir de amidos modificados de mandioca, Henrique; Cereda; Sarmento (2008) demonstraram valores de espessura menores para membranas que sofreram processo de modificação por reticulação, corroborando com os resultados deste estudo onde as membranas de colágeno modificado com e sem adição do EHPV (22,2 $\mu\text{m} \pm 1,0$; 19,3 $\mu\text{m} \pm 2,0$) mostraram-se os menos espessos dentre os grupos estudados.

A modificação do colágeno proporcionou uma membrana com menor alongamento, sem alteração da tensão máxima para rompimento, mas apresentou um aumento significativo quanto ao módulo de elasticidade. Yajima, Zanin e Cavalcanti (2010), descrevem que alteração das propriedades de Tensão e Módulo de Young em membranas de colágeno reticulado é caracterizada por uma extensibilidade muito menor do que membranas não reticuladas, possivelmente devido às ligações estabelecidas entre cadeias. Nas membranas utilizando o

colágeno modificado, a diminuição da tensão foi observada quando o extrato de própolis foi incorporado. Neste caso, os componentes presentes no extrato podem ter funcionado como agentes plastificantes, afastando as cadeias poliméricas uma das outras. Porém este efeito não proporcionou um aumento significativo na deformação.

5.1.2 Permeabilidade ao vapor de água

Permeabilidade é a propriedade de barreira das membranas avaliada através da passagem de um material permeante de um lado da membrana para o outro quando ambos são expostos a diferentes concentrações desse permeante em um determinado tempo, sendo ainda importante o conhecimento da área da membrana exposta e sua espessura (CORRÊA, 2011).

Entretanto fatores como a natureza do material permeante, tipo de concentração do plastificante, a polaridade e as interações entre as cadeias poliméricas, o tamanho e forma das moléculas que se difundem na membrana, bem como o grau de reticulação destas moléculas, poderão influenciar na permeabilidade ao vapor de água (RIGO, 2006; CORRÊA, 2011). A menor permeabilidade apresentada neste estudo pelas membranas produzidas a partir do colágeno modificado em relação à molécula original pode ser justificada pela diminuição dos espaços entre cadeias, dificultando as interações das moléculas polares (como o vapor d'água) com a matriz polimérica.

A incorporação do EHPV às membranas também proporcionou uma menor permeabilidade quando comparados à membrana de colágeno puro. De acordo com Sinha Ray e Okamoto (2003), a presença de altas concentrações de compósito provavelmente aumenta a tortuosidade do caminho que as moléculas de águas deverão percorrer para atravessar a membrana, de modo que esse longo caminho difusivo que as moléculas penetrantes deverão viajar acarreta a redução da permeabilidade.

O estudo da permeabilidade ao vapor de água em membranas à base de gelatina e aditivos com própolis realizado por Bodini (2011), demonstrou resultados onde as altas concentrações de extrato etanólico de própolis alteraram a interação

da água com a matriz polimérica. Pastor et al (2010), também verificaram que a adição de extrato etanólico de própolis em membranas de hidroxipropilmetilcelulose promoveram redução da permeabilidade ao vapor de água.

A menor permeabilidade ao vapor de água apresentada por uma membrana utilizada como curativo sugere mais vantagens à manutenção do processo de cicatrização, como afirma Franco e Gonçalves (2008). Dentre estas vantagens tem-se a prevenção da desidratação do tecido que leva à morte celular; aceleração da angiogênese; estímulo à epitelização e a formação do tecido de granulação.

5.1.3 Índice de Intumescimento

Os mecanismos de intumescimento em polímeros dependem relativamente da difusão do penetrante e estabilidade polimérica. A adsorção física do penetrante sobre a superfície satura as moléculas que tendem a migrar para a matriz associando-se aos grupos polares intermoleculares. Essa associação leva à solvatação dos grupos iônicos que enfraquece as ligações de hidrogênio, gerando uma expansão intercadeias e conseqüentemente espaços na matriz que favorecem a penetração de água e demais moléculas movidas por forças polares associadas a mecanismos de capilaridade (ASSIS, 2010).

As baixas taxas de intumescimento de membranas bioativas são propriedades desejáveis para a cobertura de feridas, por fornecer umidade em longo prazo para as feridas e minimizar o risco de ruptura da membrana (ASSIS e ALBERTINI, 2002).

Observou-se neste estudo que o intumescimento das membranas CMP foi reduzida na primeira hora da experiência, sendo proposto que os espaços estreitos entre as cadeias macromoleculares, como ocorre nas membranas CMP, dificultam a interação de moléculas polares (tais como as moléculas encontradas no vapor de água), com as matrizes poliméricas (Boanini et al, 2010; Corrêa, 2011), determinando a diminuição dos índices de intumescimento. Ainda assim, Bigi et al (2001), descrevem que em geral, o intumescimento ou propriedade hidrofílica dos materiais é diminuído com o aumento do grau de reticulação.

Esta característica decorrente do processo de reticulação de material também pode ser observado em estudo realizado por Bigi et al (2002), que objetivaram a estabilização de membranas de gelatina por reticulação com genipina, e estudo realizado por Boanini; Rubini; Panzavolta (2010), para caracterização físico-química de membranas de gelatina modificada com alginato oxidado. Em ambos, o processo de reticulação provocou uma significativa redução do índice de intumescimento.

5.2 Ensaios biológicos

5.2.1 Determinação do Índice de Retração das Feridas

Está bem estabelecido que a mensuração da área da ferida é um dos aspectos fundamentais na avaliação do processo cicatricial, podendo fornecer parâmetros que sugiram a melhora ou piora da cicatrização (VITORINO FILHO, 2011). Neste estudo, o grupo tratado com membranas de colágeno quimicamente modificado contendo EHPV exibiu índices de retração da ferida significativamente maiores que os demais grupos em três, 14, excetuando o grupo CP, e maiores que CRT e C em 21 dias. A interpretação destes dados sugere a participação de constituintes químicos presentes na própolis vermelha em etapas distintas do reparo cicatricial.

Tem sido discutido que a contração da ferida é um fenômeno extensivamente associado à diferenciação miofibroblástica, fibroblastos modificados que adquirem fenótipo contrátil em resposta ao TGF- β (MARTINEZ, 2008; MIGUITA et al, 2010).

O pico de diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos ocorre por volta do sétimo dia de reparo, com redução substancial dessas células após o décimo quarto dia (RIBEIRO et al, 2009). Contudo, no terceiro dia o processo cicatricial encontra-se ainda em sua fase inflamatória (inflamação aguda), caracterizada por exsudação plasmática e conseqüente formação de edema intersticial (DIELGEMAN, EVANS, 2004), quando não é esperada diferenciação miofibroblástica. É possível sugerir, portanto, que as menores dimensões das feridas evidenciadas no grupo CMP e CP nessa etapa do reparo cicatricial poderiam estar relacionadas a possíveis efeitos antiinflamatórios de compostos químicos presentes na própolis vermelha.

Suportando esses dados, estudos têm demonstrado a composição química e atividade biológica da própolis vermelha brasileira (ALENCAR et al, 2007), identificando a presença de flavonóides com comprovada atividade antiinflamatória, como quercetina (JOSHI et al, 2011), formononetina (LAI et al, 2012) e daidzeína (CHOI et al, 2012).

É relevante destacar que, em três dias, o grupo CP apresentou índices de retração semelhantes ao grupo CMP, embora estes tenham sido estatisticamente similares aos obtidos nos demais grupos. Estes achados parecem suportar a teoria de um provável papel modulatório desempenhado pelos constituintes do EHPV sobre a dinâmica inflamatória. Por outro lado, o fato de que os resultados observados no grupo CMP terem sido mais expressivos que em CP sugere que a modificação química da membrana poderia ter atuado prolongando a liberação dos constituintes químicos na ferida, possivelmente em resposta a uma degradação mais lenta das membranas reticuladas. Apesar desta hipótese ser embasada por trabalhos anteriores de Yamuch et al (2001), que relatam a proteólise mais lenta de moléculas de colágeno quimicamente modificadas por reticulação das cadeias polipeptídicas, estudos posteriores avaliando a cinética de degradação de membranas a base de colágeno reticulado são necessários a fim de atestar a validade desta teoria.

No 7º dia os grupos avaliados comportaram-se de maneira semelhante em relação à retração da ferida. Neste momento do processo cicatricial não há mais fase inflamatória, ocorrendo a formação de tecido de granulação. Após 3º e até o 10º a ferida se torna rica em fibroblastos que juntamente com as células endoteliais se movem para o interior da ferida, produzindo matriz extracelular e angiogênese (MASSENO et al, 2010), suportes para a migração celular, reservatório e modulador de fatores de crescimento (MENDONÇA e COUTINHO-NETO, 2009; YOUNG e MCNAUGHT, 2011). Nesta fase, os elevados teores de TGF- β determinam o início da diferenciação miofibroblástica ativa na área cicatricial (SONG et al, 2011), a fim de promover a futura contração da ferida.

Por outro lado, no 14º dia, o grupo CMP demonstrou índices de retração significativamente maiores que todos os demais grupos. Tais achados são fortemente sugestivos de um papel estimulatório da própolis vermelha sobre a

diferenciação miofibroblástica, levando à maior contração da área da ferida. Suportando estes achados, Huh et al (2011), demonstraram que a formononetina, um isoflavonóide amplamente encontrado em amostras de própolis vermelha do nordeste brasileiro, eleva significativamente a produção local de TGF- β , o que, conseqüentemente, aumentaria a diferenciação miofibroblástica. Além disso, uma vez que os miofibroblastos também sintetizam níveis elevados de proteases degradantes da matriz extracelular (MASSENO et al, 2010), é possível sugerir que a maior atividade miofibroblástica minimizaria a quantidade de colágeno produzida, reduzindo os riscos de cicatrizes hipertróficas.

Uma vez mais, o fato de que o grupo CP não apresentou resultados similares parece fortalecer que a modificação química das membranas de colágeno poderia ter determinado uma liberação mais lenta dos constituintes químicos presentes no EHPV, propiciando um efeito biológico mais prolongado.

Em 21 dias, todos os grupos onde foram usadas membranas de colágeno como cobertura das feridas apresentaram índices de retração melhores que o grupo sem cobertura (controle). Estes achados sugerem, portanto, que a utilização de coberturas para essas feridas pode ser uma vantagem ao progresso da cicatrização, fato este também discutido por Castro et al (2012). É possível que a presença de uma cobertura dérmica à base de colágeno nas fases iniciais do reparo minimize a contaminação exógena, mantenha a umidade da ferida, prevenindo a desidratação do tecido lesado, participe na modulação da angiogênese, e conseqüente formação do tecido de granulação, e acelere o fenômeno de reepitelização (LEE et al, 2001; ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009). Todos estes efeitos biológicos, portanto, determinariam um melhor processo reparativo, resultando em melhor retração da ferida.

5.2.2 Análise Semiquantitativa da Intensidade da Reação

No processo de reparo de feridas de segunda intenção, os eventos sequenciais e dinâmicos ocorridos, culminam em uma cicatrização tecidual que envolve epitelização, proliferação e fibroplasia (BALEKAR 2012; DESCHENE, 2012). Uma das principais células envolvidas neste mecanismo são os fibroblastos, estes

irão dar origem aos miofibroblastos cuja atividade contrátil é responsável pelo fechamento de feridas após a lesão, processo conhecido como contração da ferida (MASSENO et al, 2010).

A intensa reação inflamatória evidenciada no 3º dia em todos os grupos já era esperada, uma vez que logo após a injúria, ocorre em resposta às alterações vasculares e bioquímicas, uma migração imediata de neutrófilos na área lesada a fim de impedir a invasão e proliferação de microorganismos. Gradativamente estas células são substituídas por células mononucleares que dão continuidade ao processo cicatricial (BOATENG, 2008; NUNES et al, 2011).

Comumente membranas utilizadas como curativo são empregadas também como sistema de liberação de agentes ativos como antibióticos e anti-inflamatórios, mostrando bons resultados por provável veiculação do agente por mais tempo no local da lesão (BOATENG, 2008). Contudo o estudo realizado por Albuquerque-Júnior et al (2009) revelou que a própolis vermelha quando incorporada a membranas de colágeno para aplicação em feridas de segunda intenção em ratos, apresentou resposta inflamatória menos intensa no processo de cicatrização. Portanto a melhora na intensidade da reação inflamatória apresentada pelos grupos CP e CMP no 3º dia, sugere que a incorporação do EHPV às membranas de colágeno e colágeno modificado aparentemente favoreceu a instalação de eventos biológicos envolvidos no processo de cicatrização, uma vez que o colágeno embora demonstre atividades biomoduladoras, é uma molécula que não apresenta atividade anti-inflamatória (NUNES et al, 2011).

É possível especular que a ação anti-inflamatória observada quando da aplicação das membranas bioativas contendo EHPV esteja relacionada à composição química deste extrato. Daughsh et al (2007) relataram que a própolis vermelha do nordeste brasileiro é rica em isoflavonóides como a formononetina e a daidzeína. A atividade anti-inflamatória da formononetina vem sendo relatada na literatura, e parece estar relacionada a inibição da síntese de citocinas envolvidas na dinâmica inflamatória, como a IL-1 β e fator nuclear-kappa B (NF-KB), resultando em redução expressiva na síntese e liberação de óxido nítrico (NO) (WANG et al, 2012). A daidzeína, por sua vez, também vem sendo associada a inibição da síntese do NO, e da IL-6 (LIU et al, 2009; CHOI et al, 2011). No entanto, estudos

posteriores são demandados a fim de elucidar os mecanismos precisos envolvidos na atividade antiinflamatória das membranas contendo EHPV.

A presença de fibroblastos aos 14 dias se fez importante uma vez que estas células estão envolvidas na migração, proliferação, contração e produção de colágeno no processo de cicatrização (BALEKAR 2012).

De especial interesse foi o amadurecimento epidérmico mais rápido e formação precoce de fâneros cutâneos no grupo CMP, e um pouco mais tardiamente em CP. Estes dados sugerem que constituintes químicos presentes no EHPV desempenham um papel importante na proliferação de ceratinócitos. Corroborando esta hipótese, tem sido demonstrado que outros produtos naturais ricos em isoflavonóides como a formononetina e daidzeína, foram capazes de estimular a formação de fâneros cutâneos em lesões dérmicas (LIPOVAC et al, 2011).

Os resultados significativamente diferentes no 21º dia do grupo CTR em relação aos demais grupos sugerem ser a ausência da membrana bioativa na ferida um fator importante uma vez que, como já discutido por Andrade; Lima; Albuquerque (2010), diversos fatores podem atrasar ou impedir a cicatrização, como: déficit na oxigenação tecidual, infecção, necrose, ambiente seco e tamanho da ferida.

5.2.3 Análise da Deposição Colagênica

O padrão de colagenização foi bastante similar entre os grupos ao longo do tempo do experimento, com fibras esverdeadas consistentes com o tipo de predomínio de colágeno III em três e sete dias, e fibras douradas de colágeno tipo I em 14 e 21 dias. Tal padrão de colagenização está provavelmente relacionado com a fato de que o colágeno tipo III é formado nas fases iniciais da cicatrização da ferida, a fim de proporcionar uma rede fibrilar que orienta o crescimento endotelial e a formação de vasos sanguíneos para o desenvolvimento de tecido de granulação. Estas fibrilas delicadas são adicionalmente substituídos por tipo bruto de fibras de colagénio tipo I para fornecer força de tração e dar estabilidade mecânica ao tecido conjuntivo da cicatriz fibrosa (ALBUQUERQUE-JÚNIOR et al, 2009; NUNES et al, 2011; RIELLA et al, 2012). No entanto, a aplicação do EHPV incorporado às

membranas de colágeno e colágeno modificado, induziu um arranjo colagênico mais regular e homogêneo aos sete e 14 dias, mas não promoveu a formação excessiva de colágeno na fase final do processo de cura, como foi observado na análise macroscópica das feridas. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente em estudos usando membranas à base de colágeno não reticuladas contendo EHPV (Albuquerque-Júnior et al, 2009), sugerindo que este produto natural pode favorecer a proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno, e influenciar o padrão de colagenização, sem causar colagenização excessiva e a formação de cicatriz hipertrófica, contribuindo desta forma para uma evolução positiva do processo cicatricial de feridas dérmicas.

CAPÍTULO V - Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract.

Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract.

Isana Carla Leal Souza¹, Marismar Fernandes do Nascimento¹, Raquel Gonçalves de Souza Neta², José Cleveilton Dos Santos³, Luiz Pereira Costa⁴, Juliana Cordeiro Cardoso⁵, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque-Júnior^{*6}.

¹Fellow Master degree, Post-Graduation Program in Health and Environment, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in experimental procedures, manuscript preparation.

²Graduate student, Department of Biomedicine, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in the histological processing of the surgical samples.

³Graduate student, Department of Dentistry, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in the histological processing of the surgical samples.

⁴PhD. Laboratory of Synthesis of Materials and Chromatography, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in the manuscript writing, critical revision.

⁵PhD, Laboratory of Biomaterials, Department of Pharmacy, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Involved in the characterization of the membranes, manuscript writing, critical revision.

⁶PhD. Morphology and Structural Biology, Department of Medicine, University Tiradentes, Aracaju/SE, Brazil. Responsible for the design of the study, the histological examinations, manuscript preparation and supervision of all the phases of the study.

* Corresponding author: e-mail: ricardo_luiz@unit.br Tel: (55 79) 3218-2190/extension number 2615. Address: Laboratório de Morfologia e Biologia Estrutural, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes. Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, Aracaju/SE, Brasil. CEP 49032-490.

Abstract

The study evaluated the physical properties and healing potential of chemically modified collagen-based membranes containing hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis (HERP) in rodents. The collagen chemical modification was carried out through Maillard's reaction using maltodextrin as reticulant agent, and HERP was incorporated at 0.5%. The HERP-incorporated collagen-based membranes were evaluated regarding the mechanical properties, water vapor permeability and swelling rates. For the wound healing assay, surgical wounds were performed on the back of 100 rats, assigned into five groups (n=20), whose wounds were dressed as follows: (C) – original membranes; CM – modified membranes; CP – HERP-incorporated original membranes; CMP – HERP-incorporated modified membranes; CTR – undressed wounds (control). Five animals of each group were euthanized at 3, 7, 14 and 21 days and the wounded areas were macroscopic and microscopically analyzed. The CMP-membranes showed lower thickness ($p<0.05$), permeability ($p<0.001$) and swelling ($p<0.05$) than the C-membranes. The CMP-membranes promoted increased wound contraction rates at 3 ($p<0.01$), 14 ($p<0.001$) and 21 days ($p<0.01$) compared to CTR, and provided earlier granulation tissue and cutaneous appendages formation, as well as better organization of the collagen deposition. In conclusion, the CMP-membranes presented advantageous properties to be used as wound dressing and improved wound healing in rodent model.

Key-words: Collagen, chemical modification, propolis, wound healing

INTRODUCTION

Wound healing is a pathophysiological event that occurs three overlapping biological phases described by inflammatory, proliferative and remodeling phases (Broughton et al., 2006). The inflammatory phase is characterized by vascular events, which culminates with the influx of leukocytes into the wound site, in order to promote microbial and necrotic tissue elimination (Li et al., 2007). The proliferative phase refers to the proliferation of fibroblasts and endothelial cells to form the granulation tissue, and further primary collagen scar, as well as the migration of keratinocytes from the wound edges to restore the epithelial lining of the wound surface (Diegelman, Evans, 2004). The remodeling phase is characterized by

increased collagen turnover and wound contraction in an attempt to restore skin morphological and functional integrity (Rangaraj et al., 2011).

Many studies have been performed in attempt to find new biomaterials able to accelerate the biological events involved in wound healing, with no deleterious effects on the organism (Vinhas et al., 2007; Nunes et al., 2011; Sargeant et al., 2012; Seth et al., 2012). In this regard, the application of bioactive membranes produced from biocompatible, biodegradable and nontoxic materials have been successfully used as wound dressings in order to improve the healing process of a wide range of dermal wounds (Boateng et al., 2008). The type I collagen extracted from bovine tendon has been applied in the production of such membranes, not only due to its satisfactory biological properties, such as biocompatibility and atoxicity (Neel et al., 2012), but also because collagen-based membranes can act as a matrix for cell proliferation and as a suitable delivery system for drugs, isolated molecules or natural products with biological properties into the wounded area (Albuquerque-Júnior et al., 2009; Nunes et al., 2011; Riella et al., 2012).

It has been reported that the red propolis produced in the Brazilian northeastern presents distinct biological properties and chemical composition from those samples collected from other regions of the country (Nunes et al., 2009). Studies have demonstrated that these samples of Brazilian red propolis display antimicrobial, antioxidant (Alencar et al., 2007) and antitumor (Da Silva-Frozza et al., 2012). In addition, we have previously demonstrated that the incorporation of hydroalcoholic extracts of Brazilian northeastern red propolis into collagen-based dressing membranes improves wound healing in rodent model, probably by modulating the dynamics of the inflammatory response and collagenization process (Albuquerque-Júnior et al., 2009).

In the last decade, studies have proposed the chemical reticulation of the collagen chains in attempt to improve some physical properties of collagen-based membranes, such as the low mechanical strength, resulting from the extraction process, and rapid degradation by endogenous enzymes (Sionkowska et al., 2006; Becker et al., 2009). In this sense, the Maillard reaction, a chemical incorporation process of carbohydrate molecules to residues of hydroxylysine, has been successfully employed to reticulate protein polymers (Cardoso et al., 2011).

Therefore, the goal of this study was to assess the effects of the Maillard reaction-induced chemical modification of the mechanical and healing properties of collagen-based membranes containing hydroalcoholic extract of Brazilian northeastern red propolis in murine model.

MATERIAL AND METHODS

Extraction of collagen

The collagen was extracted according to the method described by Albuquerque- Junior et al. (2009), from bovine tendon which was chopped into small pieces and treated with acetone to remove fatty material. Subsequently, 5 g of tendon were washed with distilled water and placed in 10% NaCl solution (w / v) for 24h at 4°C. After this period, the tendon was again washed with distilled water and placed in a citrate buffer solution of 0.02 mol / L pH 4.3 for 48 h at room temperature, for swelling of the tissue. The swollen tissue was homogenized in 500 ml of an acetic acid solution 0.5 mol.L⁻¹ in the presence of pepsin at a ratio of 1:50 (w: w) in relation to the initial mass of the material. The gel formed was maintained for 24 hours at 4 ° C. After this period, the protein was precipitated by salting out the gel by adding 5% NaCl (w / v). The collagen precipitate was dialyzed for 72 hours against distilled water.

Modification of Polymer Using Maltodextrin (CM)

The modification of the polymer was carried out by the reaction of collagen with a polysaccharide (maltodextrin (Nidex ®)). Collagen has been placed to react with 250 mL of 3% maltodextrin, at room temperature for 30 days (Cardoso, 2005). Plus, 0.2% methylparaben was added to the middle in order to conserve the system. After this period, the material was dialyzed.

Hydroalcoholic Extract of Red Propolis (HERP)

The sample of propolis gathered from the region of the Brejo Grande / SE / Brazil (10° 25' 28" S 36° 27' 44" O) was previously crushed and homogenized. The extraction was carried out using the method of maceration. The maceration was performed using 10 g of powdered material in 1000 mL of 70% ethanol during 24

hours at room temperature, with constant stirring. After the extraction period, the alcohol was evaporated and a dry extract was obtained.

Bioactive Membranes Preparation

To obtain bioactive membranes, collagen (C) and modified (CM) were dispersed in acetic acid 0.5 mol.L⁻¹. The final polymer concentration was 1%. The extract of propolis has been previously solubilized in propylene glycol (plasticiser) and added to the dispersion of collagen. The concentration of plasticizer and HERP were 20% and 0.5% respectively on the mass of the polymer. The membranes were produced by casting process, the dispersion being poured into a polypropylene plate to allow solvent evaporation in a stove at 40 ° C. Membranes were produced with and without HERP.

Mechanical characterization: tensile testing

The mechanical analysis was carried out in a tensile strength apparatus (TA-TX2, Stable Micro Systems, England). Samples of films were cut into strips of 25 mm x 10 mm. Each strip was measured at three points with a digital micrometer (Micrometer external digital Pantec, accuracy ± 0.001 mm)) to record the thickness. Each experiment was carried out at room temperature, and 10 replicates were performed. The measure speed used was 1.0 mm s⁻¹ and the initial gauge length was 10 mm. The calculations were made by:

$$\sigma = F/A,$$

where, σ is tensile strain in Newton mm⁻², F is force in Newton, and A is cross-section area in mm².

Water vapor permeability rates

The permeability of membranes was determined by water vapor loss in a gravimetric cup film sealed method under known RH given by saturated solutions in contact with non-dissolved salt (KBr 84% RH) placed in a desiccator containing silica in a dehumidified room. Each experiment was performed with five replicates during 48 h. The permeability was calculated by:

$$WVP = (w. e) / (t. A. \Delta PV)$$

Where WVP is the water vapor transmission, w is lost mass in mg and e film's thickness, t is time, A is the area of the film and ΔPV is the difference between the vapor pressure of water inside and outside the container.

Swelling test

The film swelling studies were conducted using a neutral environment (PBS pH 7.2) and an acid medium (PBS pH 1.2). Each film sample (surface area $2 \times 3 \text{ cm}^2$) was pre-weighed and submerged into 30 ml medium in a plastic container. The weight of the film was determined at predetermined intervals after removal of excess surface water with a paper. The test was done in triplicate. The degree of swelling was calculated by:

$$I\% = (W_t \times 100) / W_o,$$

where W_t is the weight of film at time t , and W_o is the weight of dry film.

Animals and Surgical Procedures and Groups

The animals used in this study were adult male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar lineage, weighing 300 -350 g. The rats were housed in clear plastic cages with solid floors and loose hardwood chip bedding, and supplied with food and water ad libitum in a temperature and humidity-controlled environment. Experimental protocols and procedures were approved by the University Tiradentes Animal Care and Use Committee (CEUA nº 030308).

One hundred rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine-xylazine (100 mg/kg - 5mg/kg) Surgical wounds were then performed with standardized dimensions of 1 cm^2 . Animals were handled in accordance to the principles of aseptic chain in order to avoid bacterial contamination. Subsequently, rats were randomly assigned into five groups of 20 animals each as described in Table 1. After three, seven, 14 and 21 days, five animals of each group were euthanized in CO_2 chamber, and the healing/scar area was surgically removed, formalin-fixed and paraffin-embedded for further histological examinations.

Table 1. Description of the experimental groups according to the wound dressing applied in the animals.

Group Nomination (n=20)	Dressing Type Applied
CTR	Undressed
C	Original collagen
CM	Modified (reticulated) collagen
CP	HERP-incorporated original collagen
CMP	HERP-incorporated modified (reticulated) collagen

Assessment of the wound contraction rates (WCR).

For the macroscopic analysis and assessment of the wound contraction rates, after three, seven, 14, and 21 day, the craniocaudal and latero-lateral measures of each wound were assessed by a digital caliper (precision 0.01 mm), prior to the excision of the wounds, and the final wound areas were obtained through the equation:

$WCR = (A_1 - A_2)/A_1 \times 100$, where A_1 is the initial wounded area and A_2 is the final wounded area.

Histological procedures and morphological analysis.

Serial 5 μ m thick sections were obtained from the paraffin-embedded samples and stained in hematoxylin-eosin. The intensity of the inflammatory response was assessed as described in Table 2.

Table 2. Description of the parameters for histological assessment of the intensity of the inflammatory response in the wounded areas.

Score of the inflammatory response	Semiquantification of the inflammatory response	Classification of the inflammatory response
0	Absent	Absent
1	Mild	Chronic (predominance of lymphocytes and histiocytes)
2	Moderate	
3	Intense	
4	Intense	Subacute (balance of neutrophils, lymphocytes and histiocytes)
5	Intense	Acute (predominance of neutrophils)

For the assessment of the collagen deposition, histological sections stained in Sirius Red and analyzed under polarized light were used to the descriptive analysis.

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 architectural arrangement (reticular, parallel or interlaced) (Rich, Whitaker, 2005). All readings were performed by investigators blinded to treatments (six histological sections/animal).

Statistical Analysis

The average values obtained from analysis to characterize the bioactive membrane, as well as the quantitative analysis of the diameter of wounds were compared between experimental groups prefixing the level of significance with 95% ($p < 0.05$). Test was applied ANOVA followed by Tukey's test to verify existence of statistically significant differences between groups, whereas the analysis of the inflammatory infiltrate was carried out by Kruskal–Wallis test.

RESULTS

Assessment of the mechanical properties.

According to Table 3, both the chemical modification and propolis incorporation procedures reduced the membranes thickness in comparison to C group ($p < 0.05$), and the CMP were shown to be the thinner samples. In addition, although the tension values of CMP were significantly lower than C, deformation and Young module presented no significant difference between these groups.

Table 3. Assessment of the mechanical properties of C, CM, CP and CMP membranes.

Membranes	Thickness (μm)	Deformation (%)	Rupture Tension (MPa)	Young Module (MPa)
C	38.9 \pm 5.9 ^a	3.7 \pm 1.5 ^{a,c}	47.3 \pm 16.6 ^{a,b}	1308.8 \pm 232.0 ^a
CM	22.2 \pm 1.0 ^b	2.1 \pm 1.5 ^b	36.7 \pm 16.9 ^b	1972.7 \pm 664.8 ^b
CP	28.1 \pm 1.2 ^c	6.4 \pm 2.8 ^a	75.6 \pm 25.5 ^a	1232.2 \pm 263.7 ^a
CMP	19.3 \pm 2.0 ^d	2.0 \pm 1.0 ^{b,c}	17.9 \pm 5.9 ^c	1010.6 \pm 368.4 ^a

Different letters in the same column express significant different values ($p < 0.05$).

Assessment of the water vapor permeability.

As shown in Fig 1, the chemical modification of the collagen and the incorporation of the HERP reduced significantly the WvP compared to the original collagen-based membranes (C) ($p < 0.001$). However, no significant difference was observed in the WvP of CMP and CM ($p > 0.05$).

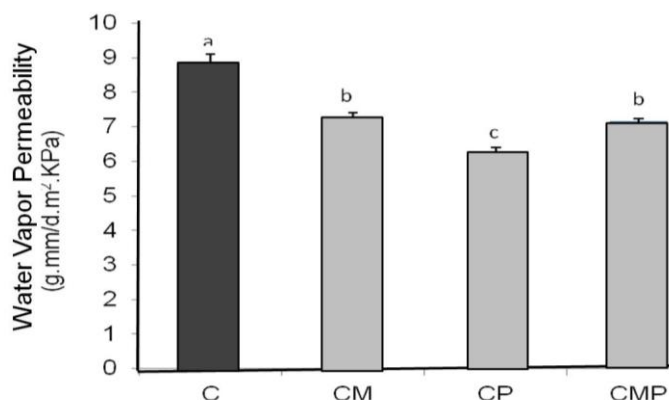


Fig 1. Assessment of the water vapor permeability (WvP) of the C, CM, CP and CMP membranes. Different letters represent significantly different WvP values ($p < 0.05$).

Assessment of the swelling rates.

Fig. 2 presents the swelling rates (SR) of the membranes at neutral (Fig. 2a) and acid (Fig. 2b) pH. In both environments, the chemical modification of the collagen reduced significantly the SR of the membranes (CM) all over the time course of the experiment. The incorporation of HERP increased the SR of the collagen-based membranes at the initial experimental times, but from 1 h, CP and CMP presented SR similar to those observed in C (original collagen-based membrane) in both pH.

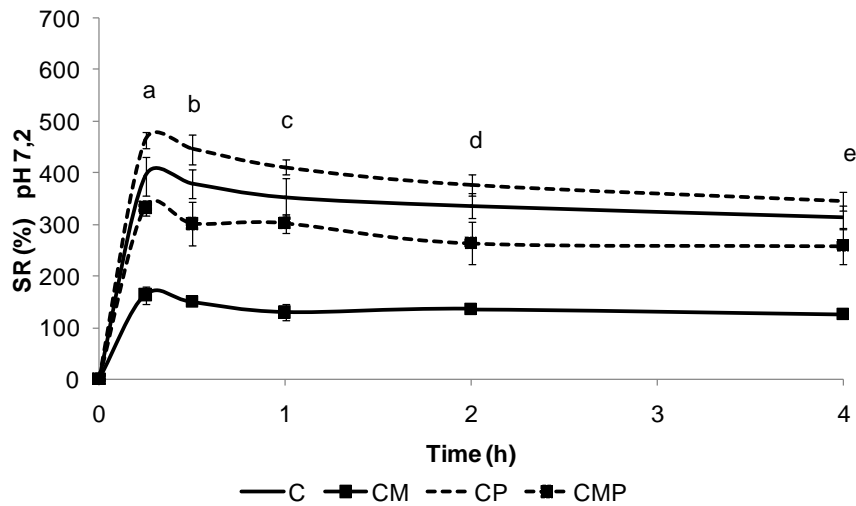


Fig 2a. Assessment of the Swelling Rates (SR) of the membranes over the time.
 (a) C is significantly different from CM ($p < 0.001$), CP ($p < 0.05$) and CMP ($p < 0.05$).
 (b) C is significantly different from CM ($p < 0.001$) and CMP ($p < 0.001$).
 (c) C is significantly different from CM ($p < 0.001$).
 (d) C is significantly different from CM ($p < 0.001$).
 (e) C is significantly different from CM ($p < 0.001$)

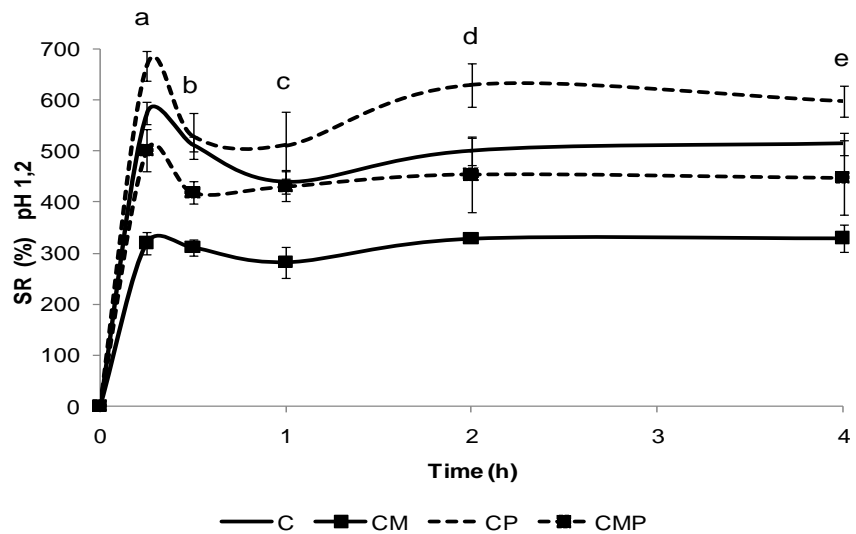


Fig 2b. Assessment of the Swelling Rates (SR) of the membranes over the time.
 (a) C is significantly different from CM ($p < 0.001$) and CP ($p < 0.05$).
 (b) C is significantly different from CM ($p < 0.001$) and CMP ($p < 0.05$).
 (c) C is significantly different from CM ($p < 0.01$).
 (d) C is significantly different from CM ($p < 0.01$).
 (e) C is significantly different from CM ($p < 0.01$)

Macroscopic analysis and assessment of the wound contraction rates (WcR).

Fig. 3 presents the macroscopic aspects of the wounds over the time course of the experiment, showing no sign of abscess formation either in the early phases (3 and 7 days) or hypertrophic cars in the final ones (14 and 21 days).

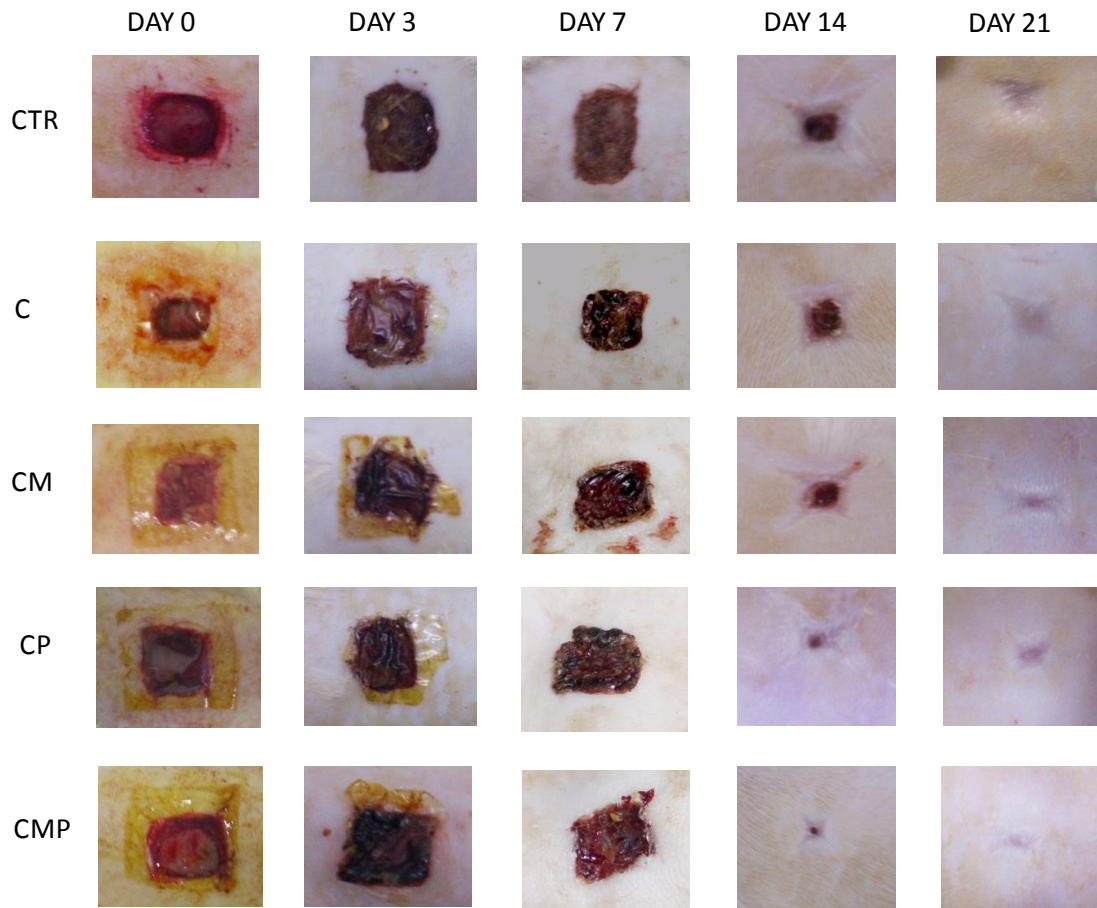


Fig 3. Macroscopic features of the wounds of the different groups over the time-course of the experiment, showing no abscess or hypertrophic/atrophic scar formation.

The WcR of all the groups increased progressively over the time course of the experiment (Fig. 4). CMP presented increased WcR compared to C at three ($p < 0.01$) and 14 days ($p < 0.001$), whereas at 21 days, all of the groups (CM, CP and CMP) showed higher WcR in relation to C ($p < 0.01$). No difference between the groups was seen at seven days ($p > 0.05$).

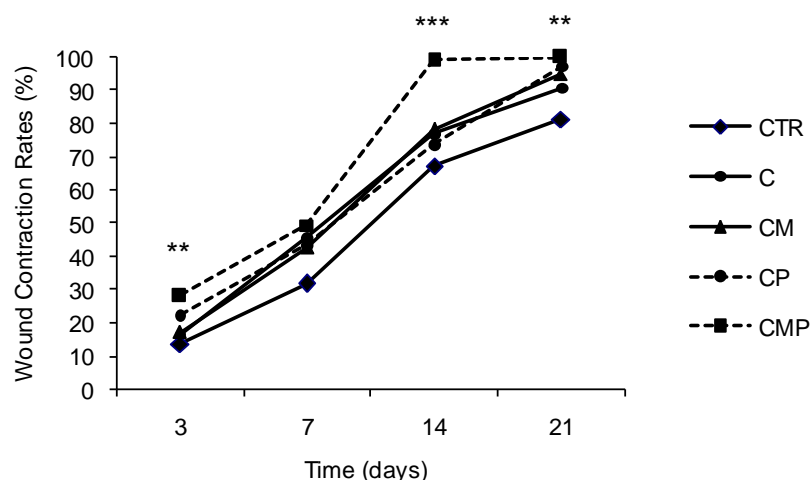


Fig 4. Assessment of the Wound Contraction rates (WcR) in the experimental groups over the time course of the wound healing biological assay
 ** CMP is significantly different from CTR ($p < 0.01$).
 *** CMP is significantly different from CTR ($p < 0.001$).

Analysis of the inflammatory response.

As demonstrated in Table 4, at three days the content of neutrophils infiltrate was significantly lower in CP than in CTR ($p < 0.01$), C ($p < 0.01$) and CM ($P < 0.01$), but there was no difference in relation to CMP ($p > 0.05$). No difference between the groups was observed in seven days ($p > 0.05$). At 14 days, the inflammatory score means observed in CTR were significantly higher than those seen in CM ($p < 0.05$) and CMP ($p < 0.001$), but no difference was evidenced between the different wound-dressed groups, irrespective to the membrane applied ($p > 0.05$). At 21 days, although all the groups exhibited only scarce residual inflammatory infiltrate, the mean scores of the wound-dressed groups (C, CM, CP and CMP) were significantly lower than CTR ($p < 0.05$).

Table 4. Histological assessment of the scores (mean \pm standard deviation) of the inflammatory response intensity in the experimental groups over the time course of the wound healing biological assay.

Time	Grups				
	CTR	C	CM	CP	CMP
3 days	5.0 \pm 0.0 ^a	5.0 \pm 0.0 ^a	5.0 \pm 0.0 ^a	4.4 \pm 0.54 ^{b,c}	4.6 \pm 0.54 ^{a,c}
7 days	3.0 \pm 0.0 ^a	3.0 \pm 0.0 ^a	3.0 \pm 0.0 ^a	2.8 \pm 0.44 ^a	3.0 \pm 0.70 ^a
14 days	2.2 \pm 0.44 ^a	1.4 \pm 0.54 ^{a,b}	1.2 \pm 0.44 ^b	1.4 \pm 0.54 ^{a,b}	0.8 \pm 0.83 ^b
21 days	1.4 \pm 0.54 ^a	0.4 \pm 0.54 ^b	0.4 \pm 0.54 ^b	0.4 \pm 0.54 ^b	0.4 \pm 0.54 ^b

Different letters in the same line represent significantly different values ($p < 0.05$).

Morphological analysis of the time course healing process.

At three days the inflammatory response was composed of intense neutrophils infiltrate, particularly in the center of the wounded areas, regardless the group (Fig. 5 a – e). At seven days, the wounds were filled with an exuberant granulation tissue, with remarkable spindle-shaped cells proliferation (fibroblasts and angioblasts) and formation of irregular and marrowed capillary vessels (Fig. 5 f – j). Clusters of amorphous eosinophilic material consistent with hyalinized collagen, interpreted as remnants of the chemically modified collage-based membranes, were observed only in CM and CMP (Fig 5 h/j). The epithelization was still incipient in all the groups, corresponding to less than 30% of the wound surface. At 14 days, there was a marked reduction of the vascular-endothelial content, and formation of a primary fibrous scar (Fig. 5 k -o). The epithelization was advanced and corresponded to more than 80% of the wound surface in all the groups. In CP and CMP, the epidermis was thicker and expressively orthokeratinized, but only in CMP the formation of cutaneous appendages rudiments, such as hairy follicles, was observed in the scar margins (Fig. 5o). At 21 days, there was a quite fibrous scar and a mature and intensely orthokeratinized epidermal tissue in all the groups. Cutaneous appendages, however, were seen in the marginal areas of CP, whereas in CMP these structures were found throughout the all the extend of the healed areas (Fig. 5 s/t),

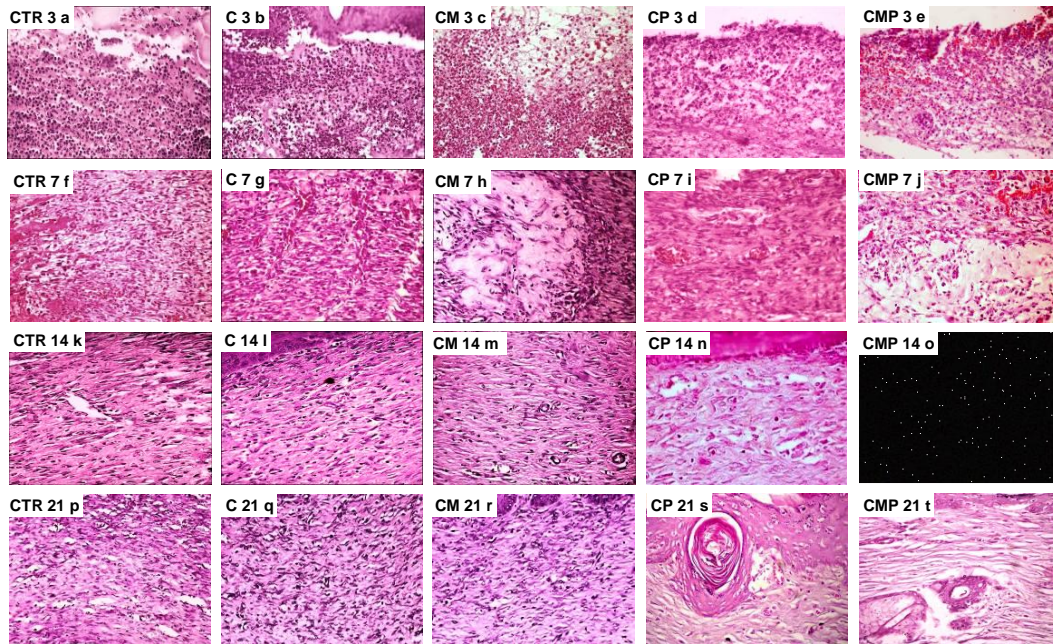


Fig 5. Histological sections of the groups (wounded areas) over the time course of the wound healing biological assay. Intense neutrophils infiltrate is seen at three days, and exuberant granulation tissue at seven days (note the presence of amorphous hyalinized material consistent with remnants of collagen-based membranes in CP and CMP (*)). At 14 days, replacement of the granulation tissue by a primary fibrous scar is seen in all the groups, but in CMP is observed the development of a rudimental hairy follicle. At 21 days, the fibrous scar tissue is denser in all the groups, whereas hairy follicles are evidenced in CP, and sebaceous glands are seen in CMP (HE, 400 x magnification).

Morphological analysis of the collagenization

At three days, extremely delicate greenish or yellow-greenish fibrillar structures (type-III collagen) with varied dimensions and reticular dispositions were observed in all the groups. In seven days, type-III collagen fibers thicker and denser, concentrated in bottom of the wounds in CTR, C and CM, but more homogeneously disposed in CP and CMP. At 14 days, there was replacement of type III for type I collagen fibers (yellow, golden and red birefringence), which were short, thin, delicate and irregularly disposed in CTR but longer and arranged in a parallel disposition in C, but presented a clear parallel arrangement in the other groups. Moreover, the fibers were longer and thicker in CP and CMP. At 21 days, all the groups presented a dense collagen-rich fibrous scar, with gross parallel arranged and interlaced fibers.

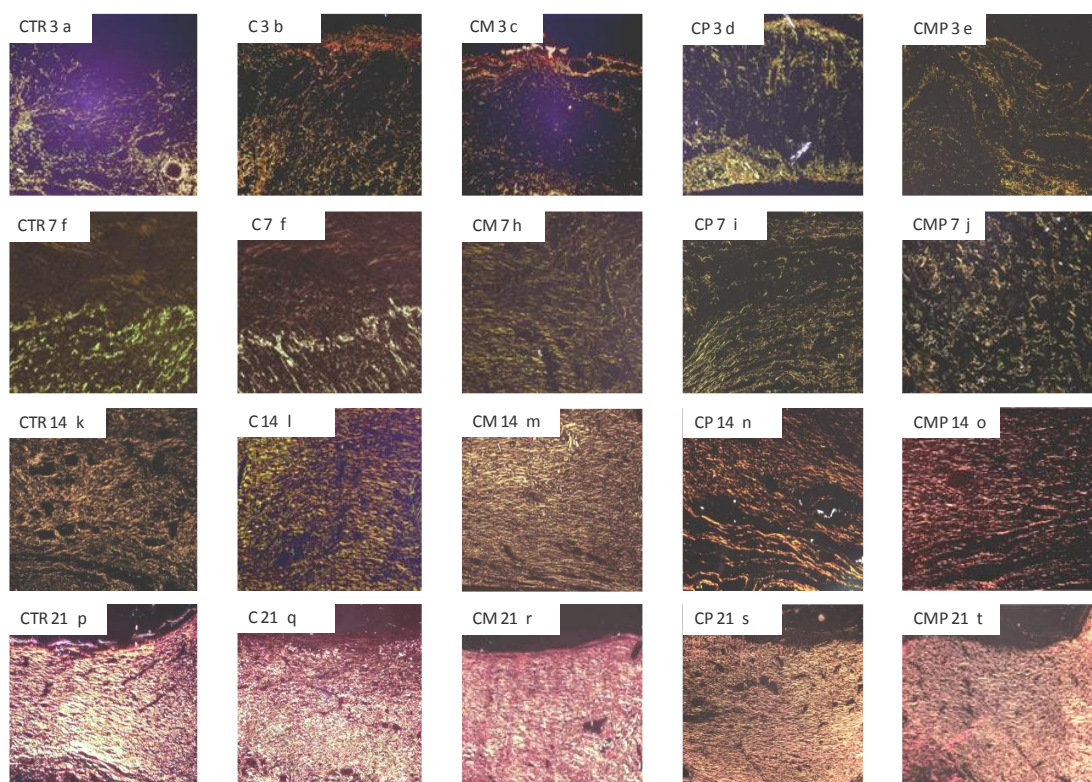


Fig. 6. Collagen deposition in the experimental groups during the time-course of the study. There is a predominance of thin delicate type III collagen fibrils (greenish birefringence) at three and seven days, whereas thicker and longer type I collagen fibers are seen at 14 days. Ggrossly interlaced type I collagen fibers are observed in all the groups at 21 days (Sirius Red/Polarized Light, 400x magnification).

DISCUSSION

The reduction in the thickness of the HERP-incorporated reticulated collagen-based membranes is likely a result of interactions between chemical groups present in both the reticulant agent (maltodextrin) and the HERP. In this study, the HERP-incorporated reticulated collagen-based membranes were thinner, but did not change the elasticity in relation to the original membrane (COL). It has been previously reported that the reticulation process enhances the interaction forces between the polypeptidic chains, reducing the thickness (Henrique et al., 2008) and elasticity of the membranes. AS the incorporation of HERP produced even thinner membranes, but with elasticity modules similar to COL, we hypothesize that interactions between alkaloid groups present in the HERP and carboxylate and amine groups of the polymer, likely through either hydrogen bond or eletrostactical interactions, might have approached the polymer, reducing the membrane thickness, while also worked as a plasticizer. However, further investigations using nuclear magnetic resonance

methods are necessary to clarify the precise intercatenary chemical interactions profiles underlying the mechanical effects on the mechanical properties of the HERP-incorporated collagen-based membranes.

Lower permeability rates are advantageous feature of dressing membranes, as long as prevent wound dehydration (Franco, Gonçalves, 2008). A decrease in the permeability of the CMP membranes was observed in this study. Other investigations have reported the reduction of the water vapor permeability of different polymeric films resulting from the incorporation of propolis extract (Pastor et al., 2010; Bodini, 2011). It has been proposed that the incorporation of HERP increased the concentration of composites into the membranes, increasing the sinuosity of the path taken by the water vapor to cross the membrane (Sinha Ray, Okamoto 2003).

Low swelling rates are desirable properties in wound dressings, as provide longer-term humidity to the wounds and minimize the risk of dressing membrane rupture (Assis, Albertini, 2002). We also observed that the swelling of the CMP membranes was reduced at the first hour of the experiment. It has been proposed that narrower spaces between the macromolecular chains, as occurs in the CMP membranes, hamper the interaction of polar molecules (such as water vapor) with the polymeric matrices (Boanini et al, 2010), which would determine lower swelling rates.

In wound healing assays, the wound contraction rates represent valuable parameters to evaluate the dynamics of the wound repair. Such biological event is closely associated to the differentiation fibroblasts into myofibroblasts, a phenotypic change mediated by transforming growth factor beta (TGF- β), a cytokine widely released by mononuclear inflammatory cells within the wound (Thannickal et al., 2003). In this study, the wound contraction rates of CMP were significantly increased in CMP at, three, 14 and 21 days.

It has been reported that the peak of myofibroblastic differentiation occurs around the seventh day of wound repair, while the number of such cells tended to decrease dramatically from the 14th day (Ribeiro et al., 2009). However, at the third day, the healing process was still in the acute inflammatory phase, when myofibroblastic differentiation was not supposed to occur yet. On the other hand, previous studies have demonstrated that Brazilian red propolis is rich in flavonoids with anti-inflammatory activity, such as quercetin, formononetin and daidzein (Joshi et al., 2012; Lai et al., 2012; Choi et al., 2012). Therefore, it is possible to suggest

that the higher wound contraction rates observed at three days is likely a result of reduced edema instead of myofibroblast-induced wound contraction. Notwithstanding, the increased wound contraction rates observed in CMP at 14 days suggest a possible stimulatory role played by HERP on the myofibroblast differentiation. Supporting this theory, it has been demonstrated that formononetin, an isoflavonoid found in Brazilian samples of red propolis, enhances the local release of TGF- β , resulting in increased myofibroblast differentiation (Huh et al., 2011).

The fact that similar findings were not observed in CP groups is suggestive that the chemical reticulation of the collagen might have promoted a prolonged release of the propolis-derived chemical compounds into the wound. In fact, only in CMP clusters of amorphous eosinophilic material consistent with hyalinized collagen, interpreted as remnants of the modified collage-based membranes, were observed at seven days, suggesting a longer-term persistence of the wound dressing. Supporting our findings, the proteolysis of collagen molecules has been demonstrated to be slower after chemical reticulation compared to wild polypeptides (Yamuch et al., 2001).

Earlier development of cutaneous appendages was observed in CP and, particularly, in CMP. These findings are suggestive that the chemical compounds play an important role in the proliferation of keratinocytes, as well as in the differentiation of such epidermal cells into cutaneous appendages. Supporting our findings, it has been recently demonstrated that other natural products rich in isoflavonoids, such as formononetin and daidzein, were able to stimulate the differentiation of cutaneous appendages in dermal lesions (Lipovac et al., 2011). Therefore, it is possible to suggest that the CMP membranes improved keratinocytes maturation and differentiation, accelerating the recovery of the epidermal tissue.

Despite the best results were observed in CMP group, the fact that all the other groups presented better histological features than CTR is strongly suggestive that the application of collagen-based dressing membranes, irrespective the presence of HERP or the chemical modification of the collagen is able to improve wound healing. These results are likely associated to the biological properties of the collagen-based wound dressing membranes, such as working as organic matrices for cell attachment and proliferation (Gopinath et al., 2004; Sionkowska et al., 2006). Moreover, wound dressings also provide a mechanical barrier to prevent bacterial

contamination and sustain the humidity of the wound environment (Boanini et al, 2010).

The pattern of collagenization was quite similar in the groups over the time course of the experiment, with greenish fibers consistent with type III collagen predominance in three and seven days, and golden type I collagen at 14 and 21 days. Such collagenization pattern is likely related to fact that type III collagen is formed in the initial phases of wound healing in order to provide a fibrillar network which orientates endothelial growth and blood vessels formation for the granulation tissue development. These delicate fibrils are further replaced by gross type I collagen fibers to provide tensile force and mechanical stability for the connective tissue of the fibrous scar (Albuquerque-Júnior et al., 2009; Nunes et al., 2011; Riella et al., 2012). Nevertheless, the application of the HERP-incorporated collagen-based membranes apparently induced a more regular and homogeneous collagen arrangement at seven and 14 days, but did not promote excessive collagen formation in the final stages of the healing process, as observed in the macroscopic analysis of the wounds. Similar findings were previously reported in previous investigations using non-reticulated collagen-based membranes containing HERP (Albuquerque Júnior et al., 2009), and suggests that this natural product might favored fibroblast proliferation and collagen deposition, and influenced the pattern of collagenization, without causing excessive collagenization and hypertrophic scar formation.

In conclusion, the membranes formed with HERP and reticulated collagen presented suitable thickness, elasticity, permeability and swelling features. In addition, the application of these new membranes was successful in improving wound healing by favoring the wound contraction and reducing the magnitude of the inflammatory response. Thereby, these membranes may be considered a promising new dressing for wound occlusion and tissue repairing.

Acknowledgements. The authors than the Foundation for Research, Institute of Technology and Research (ITP), and University Tiradentes, Brazil, for viability the experiments.

REFERENCES

Albuquerque-Junior RLC, Barreto ALS, Pires JA, Reis FP, Lima SO, Ribeiro MAG (2009). Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. *International Journal of Morphology*, 27(4): 1105-1110.

Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ilkegaki M (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113(2): 278-283

Assis OBG & Albertini LL (2009). "Water Sorption of Chitosan films: Preliminary Study for Protective Coatings on Sliced Fruits", in: *Proceedings of the 4th ISNAPOL (Natural Polymers and Composites IV)*. p 390, S. Pedro – SP, May.

Beker J, Al-Nawas B, Klein MO, Schliephake H, Terheyden H, Schwarz F (2009). Use of new cross-linked collagen membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants: a prospective, randomized-controlled double-blinded clinical multicenter study. *Clin. Oral Impl. Res.* 20(7): 742-749.

Boanini E, Rubini K, Panzavolta S (2010). Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. *Acta Biomaterialia*, 6(2): 383–388.

Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of pharmaceutical sciences*. 97(8): 2892-2923.

Bodini RB (2011). Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga.

Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE (2006). Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 117(7 Suppl):1e-S-32e-S.

Cardoso JC (2005). Modificação do colágeno pela reação de Maillard e avaliação de formulações na forma de gel desenvolvidas a partir do material modificado. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Padilha FF, Bittencourt FO, Freitas O, Nunes PS, Pereira NL, Fonseca MJV, Araujo AAS (2011). Effect of the Maillard reaction on properties of casein and casein films. *J Therm Anal Calorim*, 104(1): 249–254.

Choi EY, Jin JY, Lee JY, Choi JI, Choi IS, Kim SJ (2012). Anti-inflammatory effects and the underlying mechanisms of action of daidzein in murine macrophages stimulated with *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide. *Journal of Periodontal Research*, 47(2): 204-211.

Da Silva Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, De Souza MD, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JA, Roesch-Ely M (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*. 52:137-42.

Diegelmann RF, Evans MC (2004). Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*. 9(1): 283-289.

Franco D, Goncalves LF (2008). Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Rio de Janeiro, 35(3): 203-206.

Gopinath D, Ahmed MR, Gomathi K, Chitra K, Sehgal PK, Jayakumar R (2004). Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, 25(10): 1911-1917.

Henrique CM, Cereda MP, Sarmiento SBS (2008). Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28(1): 231-240.

Huh JE, Nam DW, Baek YH, Kang JW, Park DS, Choi DY, Lee JD (2011). Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *International Immunopharmacology*, 11(1): 46-54.

Joshi UJ, Gadge AS, D'mello P, Sinha R, Srivastava S, Govil G (2012). Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of Quercetin and its analogues. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2): 196-207.

Lai PK, Chan JY, Cheng L, Lau CP, Han SQ, Leung PC, Fung KP, Lau CB (2012). Isolation of Anti-inflammatory Fractions and Compounds from the Root of *Astragalus membranaceus*. *Phytotherapy Research*, 27(2).

Li J, Chen J, Kisher R (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 25(1): 9–18.

Lipovac M, Chedraui P, Gruenhut C, Gocan A, Kurz C, Neuber B, Imhof M (2011). Effect of red clover isoflavones over skin, appendages, and mucosal status in postmenopausal women. *Obstetrics and Gynecology International*, 2011: 1-6

Neel EAA, Bozecl, Knowles JC, Syed O, Mudera V, Day R, Hyun JK (2012). Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. *Adv. Drug Deliv. Rev.* In Press, Corrected Proof, Available online 5

Nunes LCC, Galindo AB, Deus ASO, Rufino DA, Randau KP, Xavier HS, Citó AMGL, Rolim-Neto PJ (2009). Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2B): 524-529.

Nunes PS, Albuquerque-Júnior RLC, Cavalcante DRR, Dantas MDM, Cardoso JC, Bezerra MS, Souza JCC, Serafini MR, Quitans-Jr LJ, Bonjardim LR, Araújo AAS (2011). Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 1-9

Pastor C, Sanchez-Gonzales L, Chafer M, Chiralt A, Gonzales-Martinez C (2010). Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydrate Polymers*, 82(4): 1174–1183.

Rangaraj A, Harding K, Leaper D (2011). Role of collagen in wound management. *Wounds UK*. 7(2): 54-63.

Ribeiro MAG, Albuquerque-Junior RLC, Ramalho LMP, Pinheiro ALB, Bonjardim LR, Cunha SS (2009). Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomedicine and Laser Surgery*, 27(1): 49-55.

Rich L & Whitaker P (2005). Collagen and picosirius red staining: a colorized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 22(2): 97-104.

Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Thomazzi SM (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 143(2): 656-663.

Sargeant TD, Desai AP, Banerjee S, Agawu A, Stopek JB (2012). An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*. 8(1): 124-132.

Seth AK, Geringer MR, Hong SJ, Leung KP, Mustoe TA, Galiano RD (2012). In vivo modeling of biofilm-infected wounds: a review. *Journal of surgical research*. 178(1): 330-338.

Sinha Ray S, Okamoto M (2003). Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science*, 28(11): 1539-1641.

Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska JGF, Pogg GF, Marsano IE, Maxwell CA, Wess TJ (2006). Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films. *Polymer Degradation and Stability*, 91(12): 3026- 3032.

Thannickal TC, Siegel JM, Nienhuis R, Moore RY (2003). Pattern of hypocretin (orexin) soma and axon loss, and gliosis, in human narcolepsy. *Brain Pathology*, 13(3): 340-351.

Vinhas GM, Lima SM, Santos LA, Lima MAGA, Almeida YMB (2007). Evaluation of the Types of Starch for Preparation of LDPE/Starch Blends. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50(3): 361-370.

Yamauchi K, Takeuchi N, Kurimoto A, Tanabe T (2001). Films of collagen crosslinked by S-S bonds: preparation and characterization. *Biomaterials*, 22(8): 855-863.

Capítulo VI – CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que a modificação do polímero melhorou as propriedades mecânicas da membrana bioativa e com a incorporação do EHPV incrementou a resposta fibroblástica e acelerou a maturação epidérmica, bem como a neoformação de anexos dérmicos, demonstrando assim que a utilização de membrana bioativa de colágeno modificado contendo EHPV tem ação positiva sobre o processo de cicatrização dérmica por segunda intenção.

Pesquisas para quantificação do colágeno por quantificação de hidroxiprolina, quantificação e identificação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento através do real-time PCR, poderão ser realizadas com o intuito de fortalecer os resultados demonstrados neste estudo.

Capítulo VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS-JUNIOR, S. B.; SABESAN, V. J.; EASLEY, M. E. Wound Healing Agents. **Critical Care Nursing Clinics**, v. 24, n. 2, p. 255-260, 2012.
2. ADELMAN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
3. AJANDOUZ, E.H.; DESSEAUX, V.; TAZI, S.; PUIGSERVER, A. Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems. **Food Chem**, v. 107, n. 3, p. 1244–52, 2008.
4. ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J. A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M. A. G. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. **Int. J. Morphol**, v. 27, n. 4, p. 1105-1110, 2009.
5. ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ILKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
6. ANDRADE, A. G.; LIMA, C. F.; ALBUQUERQUE, A. K. B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queimaduras**, v. 9, n. 1, p. 21-30; 2010.
7. ASSIS, O. B. G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de hmds. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 603-606, 2010.
8. AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient deprived condition. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, 181–189, 2008.

9. BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
10. BALEKAR, N.; KATKAM, N. G.; NAKPHENG, T.; JEHTAE, K.; SRICHANA, T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n.3, p. 817– 824, 2012.
11. BARRETO, A. L. S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2008.
12. BEKER, J.; AL-NAWAS, B.; KLEIN, M. O.; SCHLIEPHAKE, H.; TERHEYDEN, H.; SCHWARZ, F. Use of new cross-linked collagen membrane for the treatment of dehiscence-type defects at titanium implants: a prospective, randomized-controlled double-blinded clinical multicenter study. **Clin. Oral Impl. Res.** v. 20, n. 7, p. 742/749, 2009.
13. BIGI, A.; COJAZZI. G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI. N.; RUBINI. K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, v.23, n. 24, p. 4827–4832, 2002.
14. BIGI, A.; COJAZZI. G.; PANZAVOLTA, S.; RUBINI. K.; ROVERI N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. **Biomaterials**, v.22, n. 8, p.763-768, 2001.
15. BISPO-JUNIOR, W.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D. W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.
16. BOANINI E.; RUBINI K.; PANZAVOLTA S. Chemico-physical characterization of gelatin films modified with oxidized alginate. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 2, p. 383-388, 2010.

17. BOATENG J. S.; MATTHEWS K. H.; STEVENS H. N. E.; ECCLESTON G. M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892-2923, 2008.
18. BODINI, R. B. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2011.
19. CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.
20. 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 – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
21. CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; PADILHA, F. F.; BITTENCOURT, F. O.; FREITAS, O.; NUNES, P. S.; PEREIRA, N. L.; FONSECA, M. J. V.; ARAUJO, A. A. S. Effect of the Maillard reaction on properties of casein and casein films. **J Therm Anal Calorim**, v. 104, n. 1, p. 249–254, 2011.
22. CASTRO, F. C.; MAGRE, A.; CHERPINSKI, R.; ZELANTE, P. M.; NEVES, L. M.; ESQUISATTO, M. A.; MENDONÇA, F. A.; SANTOS, G. M. Effects of microcurrent application alone or in combination with topical *Hypericum perforatum L.* and *Arnica montana L.* on surgically induced wound healing in Wistar rats. **Homeopathy**, v.101, n. 3, p. 147-153, 2012.
23. CHIRITA, M. Mechanical Properties of Collagen Biomimetic Films Formed in the Presence of Calcium, Silica and Chitosan. **Journal of Bionic Engineering**, v. 5, n. 2, p. 149-158, 2008.
24. CHOI E. Y.; JIN J. Y.; LEE J. Y.; CHOI J. I.; CHOI I. S.; KIM S. J. Anti-inflammatory effects and the underlying mechanisms of action of daidzein in murine macrophages

stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. **J Periodontal Res.** v. 47, n. 2, p. 204-211, 2012.

25. CONTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins. **Patologia Estrutural e Funcional.** Editora Guanabara Koogan, 6ª edição. Rio de Janeiro-RJ, 2000.
26. CORRÊA, S. J. P. **Utilização de filmes a base de pectina contendo extrato de própolis vermelha para recobrimento de sementes de girassol.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2011.
27. CORREIA-OLIVEIRA, M. E.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAUJO, E. D. Apicultores do Estado de Sergipe, Brasil. **Scientia plena.** v. 6, n. 1, p. 1-7, 2010.
28. DARBY, I. A.; HEWITSON, T. D. Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. **International Review of Cytology**, v. 257, p. 143-179, 2007.
29. DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**, v.5, n. 4, p. 435-441, 2007.
30. DESCHENE, K.; CE´LESTE, C.; BOERBOOM, D.; THEORET, C. L. Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1. **Journal of Dermatological Science**, v. 65, n. 1, p. 12–18, 2012.
31. DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience.** v. 9, n. 1, p. 283-289, 2004.
32. FATHIMA, N. N.; RAO, J. R.; NAIR, B. U. Effect of UV irradiation on the physico-chemical properties of iron crosslinked collagen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 105, n. 3, p. 203-206, 2011.
33. FRANCO, D.; GONCALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 35, n. 3, p. 203-206, 2008.

34. FULIANG, H.U.; HEPBURN H.R.; XUAN, H.; CHEN, M.; DAYA, S.; RADLOFF S.E. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. **Pharmacol. Res.** v. 51, n. 2, p. 147–152, 2005.
35. FUNARI, C. S. I.; FERRO, V. O. ANÁLISE DE PRÓPOLIS. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.
36. GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clin Plastic Surg.**v. 39, n. 1, p. 85–97, 2012.
37. GATNAU, J. R. G.; GONZALO, A. C.; FERNANDEZ, M. A.; SANZ, L. P. Cierre por segunda intencion de defectos cutâneos posquirurgicos second intention healing of postsurgical skin wounds. **Piel (barc).** v. 27, n. 7, p. 408–415, 2012.
38. GINDL, W.; MARTINSCHITZ, K.; BOESECKE, P.; KECKERS, J. Changes in the Molecular Orientation and Tensile Properties of Uniaxially Drawn Cellulose Films. **Biomacromolecules**, v. 7, n.11, p. 3146-3150, 2006.
39. GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de ratos.** Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
40. GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; GOMATHI, K.; CHITRA, K.; SEHGAI, P. K.; JAYAKUMAR, R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1911-1917, 2004.
41. GROVER, C. N.; GWYNNE, J. H.; PUGH, N.; HAMAIA, S.; FARNDAL, R. W.; BEST, S. M.; CAMERON, R. E. Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 8, p. 3080–3090, 2012.
42. HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.

43. HOYAMA, E.; SHELLINI S. A.; PELLIZON, C. H.; MARQUES, M. G. A.; PADOVANI, C. R.; ROSSA, R. Tratamento de feridas cutâneas extensas usando tecido dérmico acelular porcino com e sem cobertura impermeável. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 4, p. 369-374, 2005.
44. HUH J. E.; NAM D. W.; BAEK Y.H.; KANG J.W.; PARK D.S.; CHOI D.Y.; LEE J.D. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. **Int Immunopharmacol**. v. 11, n. 1, p. 46-54, 2011.
45. IIO, A.; OHGUCHI, K.; MARUYAMA, H.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; ICHIHARA, K.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP1 macrophages. **Phytomedicine**, v. 19, n. 5, p. 383-388, 2012.
46. IIO, A.; OHGUCHIA, K.; INOUEB, H.; MARUYAMAC, H.; ARAKIC, Y.; NOZAWAA, Y.; ITO, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR_ activation. **Phytomedicine**. v. 17, n. 12, p. 974–979, 2010.
47. JOSHI, U. J.; GADGE, A. S.; D’MELLO, P.; SINHA R.; SRIVASTAVA, S.; GOVIL, G. Anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activity of Quercetin and its analogues. **J Ethnopharmacol**. v. 130, n. 2, p. 196-207, 2012.
48. KARAKISAWA, T.; YAMADA, T.; SEKINE, M.; ISHII, H.; SATOH, C.; MILLINGTONC, K. R.; NAKATAA, M. Thermal luminescence spectra of polyamides and their Maillard reaction with reducing sugars. **Luminescence**. v. 27, n. 5, p. 362–370, 2012.
49. KIM, H. N.; HONG, Y.; KIM, M. S.; KIM, S. M.; SUH, K-Y. Effect of orientation and density of nanotopography in dermal wound healing. **Biomaterials**. v. 33, n. 34, p. 8782-8792, 2012.
50. KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v. 203, n. 1-3, p. 93–99, 2010.

51. KWAK, E. J.; LIM, S. I. The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control. **Amino Acids**, v. 27, n. 1, p.85–90, 2004.
52. LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: Preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 267-271, 1998.
53. LAI P. K.; CHAN J. Y.; CHENG L.; LAU C. P.; HAN S. Q.; LEUNG P. C.; FUNG K. P.; LAU C. B. Isolation of Anti-inflammatory Fractions and Compounds from the Root of *Astragalus membranaceus*. **Phytother Res.** v. 27, n. 2, 2012.
54. LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **Int. J. Pharm.** v. 221, n. 1-2, p. 1-22, 2001.
55. LEE, J. E.; PARK, J. C.; HWANG, Y. S.; KIM, J. K.; KIM, J. G.; SUH, H. Characterization of UV-irradiated Dense/porous Collagen Membranes: Morphology, Enzymatic Degradation, and Mechanical Properties. **Yonsei Medical Journal.** v. 42, n. 2, p. 172-179, 2001.
56. LIPOVAC, M.; CHEDRAUI, P.; GRUENHUT, C.; GOCAN, A.; KURZ, C.; NEUBER, B.; IMHOF, M. Effect of red clover isoflavones over skin, appendages, and mucosal status in postmenopausal women. **Obstet Gynecol Int.** v. 2011, p. 1-6, 2011.
57. LIU, M. H.; LIN, Y. S.; SHEU, S. Y.; SUN, J. S. Anti-inflammatory effects of daidzein on primary astroglial cell culture. **Nutritional Neuroscience.** v. 12, n. 3, p. 123-134, 2009.
58. MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; MENDONÇA, L. S.; ORELLANA, S. C.; ARAUJO, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia plena**, v. 7, n. 4, p. 1-4, 2011.
59. MANARA, L.R.B.; GROMATZKY, A.; CONDE, M.C.; BRETZ, W.A. Utilização da própolis em Odontologia. **F.B.O.**, v. 7, n. 3/4, p. 15-20, 1999.

60. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An Bras Dermatol.** v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
61. MARTINEZ, E. F. **Estudo da expressão da α -actina de músculo liso em cultura de células de polpas dentárias e gengivas humanas tratadas com o fator de transformação de crescimento- β 1 (tgf- β 1).** Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciencias Biomedicas da Universidade de São Paulo, São Paulo 2008.
62. MARTINS, G. B.; REIS, S. R. A.; SILVA, T. M. C. Expressão do colágeno I em carcinomas epidermóides da cavidade oral. **Pesqui Odontol Bras.** v. 17, n. 1, p. 82-88, 2003.
63. MASSENO, A. P. B.; PORTO, C. D.; NUNES, L. C.; SEQUEIRA, J. L.; ALVARENGA, M. A. Miofibroblastos: Revisão de Literatura. **Vet. e Zootec.** v. 17, n. 2, p. 177-190, 2010.
64. MENDONÇA, L. S.; MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; ORELLANA, S. C.; CARDOSO, J. C.; ARAÚJO, E. D. Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha. **Scientia plena**, v. 7, n. 10, p. 1-6, 2011.
65. MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.** v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.
66. MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.** v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.
67. MEYER, A. L. M.; BERGER, E.; MONTEIRO-JUNIOR, O.; ALONSO, P. A.; STAVALO, J. N.; GONÇALVES, M. P. S. Quantitative and qualitative analysis of collagen types in the fascia transversalis of inguinal hernia patients. **Arq Gastroenterol.** v. 44, n. 3, p. 230-234, 2007.
68. MIGUITA, L.; MARTINEZ, E. F.; ARAÚJO, N. S.; ARAÚJO V. C. FGF-2, TGF β -1, PDGF-A and respective receptors expression in pleomorphic adenoma myoepithelial cells: an *in vivo* and *in vitro* study. **J Appl Oral Sci.** v. 18, n. 1, p. 83-91, 2010.

69. MONACO, J. L.; LAWRENCE, W. T. Acute wound healing an overview. **Clin Plastic Surg.** v. 30, n. 2003, p. 1–12, 2003.
70. MONTOYA, M. H. U.; MOSCOSO, J. L. A.; JATOMEA, M. P.; ORTEGA, H. S.; SÁNDE, O. R.; LOPEZ, J. L. C.; RIOS, E. M.; BRAUER, J. M. E. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan–collagen biofilms. **Bioresource Technology.** v. 101, n. 11, p. 4212–4219, 2010.
71. MORISCOT, A. S.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. A. **Histologia para Fisioterapia e outras Áreas da Reabilitação.** 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
72. NEEL, E. A. A.; BOZEC, L.; KNOWLES, J. C.; SYED, O.; MUDERA, V.; DAY, R.; HYUN, J. K. Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient. **Adv. Drug Deliv. Rev.** In Press, Corrected Proof, Available online 5, 2012.
73. NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; RUFINO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM-NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.
74. NUNES, P. S.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; CAVALCANTE, D. R. R.; DANTAS, M. D. M.; CARDOSO, J. C.; BEZERRA, M. S.; SOUZA, J. C. C.; SERAFINI, M. R.; QUITANS-JR, L. J.; BONJARDIM, L. R.; ARAÚJO, A. A. S. Collagen-Based Films Containing Liposome-Loaded Usnic Acid as Dressing for Dermal Burn Healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology,** v. 2011, p. 1-9, 2011.
75. NUNES, P. S.; BEZERRA, M. S.; COSTA, L. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; RODRIGUES, M. O.; BARIN, G. B.; SILVA, F. A.; ARAÚJO, A. A. S. Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.** v. 99, n. 3, p. 1011-1014, 2010.

76. OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**. v. 77, n. 2, p. 208–213, 2011.
77. ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **J. Ethnopharmacol.** v. 84, n. 2-3, p. 265-273, 2003.
78. PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **J Agric. Food Chem.** v. 52, n. 5, p. 1100–1103, 2004.
79. PASTOR, C.; SANCHEZ-GONZALES, L.; CHAFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALES-MARTINEZ, C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1174–1183, 2010.
80. PEREIRA, A. P. V.; VASCONCELOS, W. L.; ORÉFICE, R. L. Novos Biomateriais: Híbridos Orgânico-Inorgânicos Bioativos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 9, n. 4, p. 104-109, 1999.
81. PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO-NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.
82. RIBEIRO, M. A. G.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; RAMALHO, L. M. P.; PINHEIRO, A. L. B.; BONJARDIM, L. R.; CUNHA, S. S. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. **Photomedicine and Laser Surgery**. v. 27, n. 1, p. 49-55, 2009.
83. RICH, L. & WHITAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a colorized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**. v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.

84. RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J.S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.
85. RIGO, L.N. **Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguia das Missões, Erechim, 2006.
86. ROCHA, G. O. **Obtenção de filmes biodegradáveis a partir de misturas de amido de mandioca e extrato protéico de soja**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.
87. RODRIGUES, V. **Análise dos efeitos do colágeno bovino na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
88. ROSE, M. T. Effect of growth factors on the migration of equine oral and limb fibroblasts using an in vitro scratch assay. **The Veterinary Journal**. v. 193, n. 2, p. 539–544, 2012.
89. ROTHAMEL, D.; SCHWARZ, F.; SAGER, M.; HERTEN, M.; SCULEAN, A.; BECKERET, J. Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: na experimental study in the rat. **Clin. Oral Impl. Res.** v. 16, n. 3, p. 369-378, 2005.
90. ROSSI A.; LONGO R.; RUSSO A.; BORRELLI F.; SAUTEBIN L. **The role of the phenetyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis**. *Fitoterapia*, v. 73, Supp. 1, p. S30-S37, 2002.
91. SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C.; CASTRO, S. L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 5, n. 3, p. 317-324, 2007.

92. SANFORD, M. T. Apicultura no Brasil: um gigante adormecido desperta. Parte II. **Mensagem Doce**.v. 84, p. 24-27, 2005.
93. SANTOS, P. P. A.; FREITAS, V. S.; FREITAS, R. A.; PINTO, L. P.; SOUZA, L. B. Relação entre Mastócitos e Células T na Inflamação Odontol. **Clín.-Cient.** v. 9, n. 3, p. 215-217, 2010.
94. SARGEANT, T. D.; DESAI, A. P.; BANERJEE, S.; AGAWU, A.; STOPEK, J. B. An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration. **Acta Biomaterialia.** v. 8, n. 1, p. 124-132, 2012.
95. SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 27, p. 1-10, 2011.
96. SETH, A. K.; GERINGER, M. R.; HONG, S. J.; LEUNG, K. P.; MUSTOE, T. A.; GALIANO, R. D. In vivo modeling of biofilm-infected wounds: a review. **Journal of surgical research.** v. 178, n. 1, p. 330-338, 2012.
97. SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology.** v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011.
98. SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicação para a saúde. **Ver. Nutr.** v. 24, n. 6, p. 895-904, 2011.
99. SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **eCAM.** v. 5, n. 3, p. 313-316, 2007.
100. SINHA RAY, S.; OKAMOTO, M.. Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. **Progress in Polymer Science**, v. 28, n. 11, p. 1539–1641, 2003.
101. SIONKOWSKA, A.; SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J.; GAWRON, M.; KOZLOWSKA, J.; PLANECKA, A. Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin

- hydrolysates. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 47, n. 4, p. 570-577, 2010.
102. SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J. G. F.; POGG, G. F.; MARSANO, I. E.; MAXWELL, C. A.; WESS, T. J. Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen/chitosan thin films. **Polymer Degradation and Stability**.v. 91, n. 12, p. 3026-3032, 2006.
103. SOBRAL P. J. A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n. 6, p.1251-1259, 2000.
104. SONG, R.; BIAN, H.; LAI, W.; CHEN, H.; ZHAO, K. Normal skin and hypertrophic scar fibroblasts differentially regulate collagen and fibronectin expression as well as mitochondrial membrane potential in response to basic fibroblast growth factor. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 5, p. 381-496, 2011.
105. TEO, T. C.; NAYLOR, I. L. Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol. **British Journal of Plastic Surgery**, v.48, n. 4, p. 198-202, 1995.
106. TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Quim. Nova**.v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.
107. TORRES, R. N. S.; LOPES, J. A. D.; MOITA NETO, J. M.; CIPO, A. M. G. L. Constituintes voláteis de própolis piauiense. **Quim. Nova**.v. 31, n. 3, p. 479-485, 2008.
108. TRUSHEVA, B.; POPOVA, M., BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **eCAM**. v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.
109. VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**. v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.

110. VINHAS, G. M.; LIMA, S. M.; SANTOS, L. A.; LIMA, M. A. G. A.; ALMEIDA, Y. M. B. Evaluation of the Types of Starch for Preparation of LDPE/Starch Blends. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.v. 50, n. 3, p. 361-370, 2007.
111. VITORINO-FILHO R. N. L. **Uso de polissacarídeo extraído do exsudato de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) na terapêutica tópica de feridas.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.
112. VRANA, N. E.; ELSHEIKH, A.; BUILLES, N.; DAMOUR, O.; HASIRCI, V. Effect of human corneal keratocytes and retinal pigment epithelial cells on the mechanical properties of micropatterned collagen films. **Biomaterials**, v. 28, n. 29, p. 4303-4310, 2007.
113. WANG, Y.; ZHU, Y.; GAO, L.; YIN, H.; XIE, Z.; WANG, D.; ZHU, Z.; HAN, X. Formononetin Attenuates IL-1 β -Induced Apoptosis and NF- κ B Activation in INS-1 Cells. **Molecules**. v. 17, n. 9, p. 10052-10064, 2012.
114. WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiol Rev**. v. 83, n. 3, p. 835-870, 2003.
115. WOLF, K. L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir de fibra e pó de colágeno.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.
116. YAJIMA E. M.; ZANIN G. M.; CAVALCANTI O. A. **Caracterização Térmica de Filmes Isolados de Gelatina-Quitossana Modificados com Genipina.** Lat. Am. J. Pharm. v. 29, n. 3, p. 436-442, 2010.
117. YAMAUCHI, K.; TAKEUCHI, N.; KURIMOTO, A.; TANABE, T. Films of collagen crosslinked by S-S bonds: preparation and characterization. **Biomaterials**. v. 22, n. 8, p. 855-863, 2001.
118. YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery**. v. 29, n. 10, p. 475-479, 2011.

119. ZAGRIS, N. Extracellular matrix in development of the early embryo. **Micron**, v. 32, n. 4, p. 427-438, 2001.

ANEXO

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO DO EFEITO DE FILMES BIOATIVOS DE COLÁGENO CONTENDO PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA SOBRE O PROCESSO DE REPARO CICATRICIAL POR SEGUNDA INTENSÃO DE FERIDAS CIRURGICAS EM MODELOS MURINO

Investigador Responsável Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior

Data da Versão 05/03/2008

Cadastro 030308

Data do Parecer 06/05/2008

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Geral

Analisar o efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de própolis verde incorporado a filmes bioativos de colágeno I sobre processo de reparo cicatricial por feridas cirúrgicas.


Específicos

- Avaliar clinicamente o processo de reparo cicatricial de feridas tratadas com filmes bioativos de colágeno acrescido de extrato hidroalcoólico de própolis verde.
- Analisar morfológicamente a influência do tratamento com filmes bioativos de colágeno acrescido de extrato hidroalcoólico de própolis verde sobre a intensidade da reação inflamatória durante o processo de reparo cicatricial de feridas.
- Analisar morfológicamente a influência do tratamento com filmes bioativos de colágeno acrescido de extrato hidroalcoólico de própolis verde sobre a dinâmica de deposição colagênica durante o processo de reparo cicatricial de feridas.

Sumário do Projeto

A própolis é uma substância resinosa balsâmica de consistência viscosa e cor variada, fabricada por abelhas (*Apis mellifera* L.), cujas propriedades terapêuticas dependem da origem botânica, localização geográfica e procedência. Extratos hidroalcoólicos da própolis têm sido utilizados em diferentes situações como agentes antimicrobianos, antiinflamatórios e aos poucos vem sendo discutido sobre o seu potencial como agente cicatrizante. Assim, o objetivo deste projeto consiste em realizar um estudo histomorfológico do efeito de extratos de própolis verde sobre o processo de reparo cicatricial de feridas, em modelo murino. Para tanto, extratos hidroalcoólicos de própolis verde serão incorporados a filmes bioativos, preparados a partir de colágeno I extraído de tendão bovino, e aplicados sobre feridas padronizadas previamente confeccionadas em dorso de ratos. Os animais serão sacrificados 3,7 e 14 dias após esses procedimentos e a área de cicatrização será examinada e analisada microscopicamente. Tenciona-se, com isso, obter informações primárias acerca de um provável potencial cicatrizante dessa variedade da própolis. Os achados morfológicos a serem observados nesta pesquisa teriam, portanto, enorme potencial de aplicabilidade clínica, seja nas mais diversas áreas da odontologia (estomatologia, endodontia, cirurgia bucomaxilofacial, etc), seja em áreas afins das ciências biomédicas. Não se deve deixar de destacar, outrossim, que os resultados desta pesquisa, se favoráveis e em consonância com o esperado, poderão culminar na identificação de um importante viés comercial para a própolis verde.

Áreas Metodológicas / Temas	Símbolo
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas


Barbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Devem ser melhor caracterizados: objetivos geral e específicos

Pacientes e Métodos	
Definimento	Adequado
Tamanho de amostra	Total Local
Cálculo do tamanho da amostra	Não informado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco-benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação as Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Todos as etapas foram devidamente esclarecidas.

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas
----------------------------	-----------

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Projeto de grande relevância.


Barbara Lima Simioni Leite
 Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
 Universidade Tiradentes.