

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

TALITA FARAJ FARIA

**ESTUDO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS VERDE NO TRATAMENTO DE LESÃO DE PELE
INDUZIDA EM RATOS *WISTAR* ADULTOS**

BRASÍLIA-DF

2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

TALITA FARAJ FARIA

**ESTUDO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS VERDE NO TRATAMENTO DE LESÃO DE PELE
INDUZIDA EM RATOS WISTAR ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Enfermagem.

Área de concentração: Cuidado, Gestão e Tecnologias em Saúde e Enfermagem

Linha de pesquisa: Processo de cuidar em saúde e enfermagem

Tema de pesquisa: Enfermagem em Estomaterapia

Orientadora: Ivone Kamada

Coorientadora: Livia Cristina Lira de Sá Barreto

BRASÍLIA-DF

2022

FF224e Faraj Faria, Talita
Estudo da atividade cicatrizante do extrato de própolis verde no tratamento de lesão de pele induzida em ratos wistar adultos / Talita Faraj Faria; orientador Ivone Kamada; co-orientador Livia Cristina Lira de Sá Barreto. -- Brasília, 2022.
114 p.

Tese (Doutorado em Enfermagem) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. Própolis. 2. Ferimentos e lesões. 3. Cicatrização. 4. Farmacognosia. 5. Estomaterapia. I. Kamada, Ivone, orient. II. Lira de Sá Barreto, Livia Cristina, co-orient. III. Título.

TALITA FARAJ FARIA

ESTUDO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NO TRATAMENTO DE LESÃO DE PELE INDUZIDA EM RATOS *WISTAR* ADULTOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Enfermagem.

Aprovado em 19 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Ivone Kamada
Universidade de Brasília
Presidente da banca

Professora Doutora Ana Lúcia da Silva
Universidade de Brasília
Membro efetivo

Professora Doutora Izabella Chrystina Rocha
Universidade Federal do Mato Grosso
Membro efetivo

Professora Doutora Poliana Pereira Costa Rabelo
Universidade Federal do Maranhão
Membro efetivo

Professora Doutora Elaine Barros Ferreira
Universidade de Brasília
Membro suplente

*Dedico este trabalho aos meus colegas
enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem
vítimas da pandemia de Covid-19.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, Adriana (mãe), Guilherme e Júlia (irmãos), bem como meu marido Leonardo por todo carinho, apoio e incentivo ao longo dos anos, me incentivando a buscar o conhecimento e a evolução como ser humano e profissional de saúde.

À minha irmã, Roberta Faraj Faria, pelo auxílio dado durante a coleta dos dados da pesquisa, bem como apoio e incentivo durante toda nossa jornada de vida até o momento.

À minha orientadora, professora Dra. Ivone Kamada, por me acompanhar desde a graduação, pelo constante incentivo a realizar pesquisas na área da Estomaterapia, pelas orientações dadas para construção deste estudo e contribuição para a minha evolução como profissional de saúde.

À professora Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto, minha coorientadora, pelas sugestões, incentivo e apoio incondicional desde o esboço deste estudo até sua conclusão. Seu cuidado e preocupação comigo durante a pandemia de covid-19 me fizeram sentir o acolhimento e a generosidade em sua essência.

À Ma. Jéssica Thalita Fernandes Alves da Silva, Farmacêutica Juliana Hocsis Braga e aos técnicos e demais professores responsáveis pelo Laboratório de Tecnologias, Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC), da Universidade de Brasília, pelo suporte e auxílio durante o desenvolvimento do produto inovador utilizado nesta pesquisa.

À professora Dra. Ana Lúcia da Silva, por transmitir com leveza e profissionalismo todo seu conhecimento em Estomaterapia, incentivando a busca pelo conhecimento e aprimoramento nesta área.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Pedro Sadi Monteiro e Paula Elaine Diniz dos Reis, do Departamento de Enfermagem da Universidade de Brasília, pelas sugestões dadas durante o Exame de Qualificação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Universidade de Brasília, pelo conhecimento compartilhado, que serviu de base para a execução deste estudo.

Às empresas Mel do Sol e Evonik pelo apoio e fornecimento de parte dos insumos usados nesta pesquisa.

Aos veterinários Rafael Rocha de Andrade e Helder, responsáveis pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pelo suporte e auxílio durante a coleta de dados da pesquisa.

À técnica de laboratório Maria da Glória da Silva e estagiários do Laboratório de Técnicas Histológicas (LTH/NUPMIA) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pelo auxílio durante a confecção das lâminas histológicas e análise do material produzido.

À professora Izabel Cristina Rodrigues da Silva pelo auxílio e análise das amostras de sangue dos animais utilizados neste estudo.

Às professoras Izabella Chrystina, Poliana, Ana Lúcia e Elaine, por aceitarem fazer parte da banca examinadora.

Aos amigos enfermeiros Fátima Sicca Lopes, Rafael Gonçalves, Rachel Servulo Jacinto de Oliveira, Gisélia Macedo de Oliveira, Carla Verônica Viana Santos, Lorena Pontes Veras, Creuza Maria, Paola Farias e demais colegas de Rede SARAH de Hospitais de Reabilitação pelo apoio durante a minha especialização em Estomaterapia e no Doutorado. Serei sempre grata pelo carinho e palavras de incentivo.

Aos alunos de graduação extensionistas do Serviço Ambulatorial de Enfermagem em Estomaterapia (SAEE-HUB/UnB), em especial à Carlyne Ohana de Sousa, pelo apoio e auxílio durante a etapa de coleta de dados desta pesquisa.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir”.

Albert Einstein

RESUMO

FARIA, T.F. **Estudo da atividade cicatrizante do extrato de própolis verde no tratamento de lesão de pele induzida em ratos *wistar* adultos.** 2022. 114 p. Tese (Doutorado). Departamento de Enfermagem, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal, 2022.

Introdução: O processo de cicatrização se inicia após lesão tecidual de qualquer natureza, sendo considerado um processo complexo que envolve fenômenos químicos, biológicos e físicos. A própolis é uma resina produzida pelas abelhas e desde a antiguidade é utilizada como medicamento para tratar afecções cutâneas, devido sua propriedade cicatrizante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anestésica, imunomoduladora, hepatoprotetora, entre outras. **Objetivo:** avaliar o potencial cicatrizante de um produto em pó formulado à base de própolis verde em lesão aguda induzida em ratos adultos. **Método:** trata-se de um estudo experimental realizado com 27 ratos da linhagem *wistar* divididos aleatoriamente em três grupos pré-definidos (tratamento, controle positivo e controle negativo). As lesões foram induzidas cirurgicamente e tratadas com os produtos em teste (pó à base de própolis verde, Brava *Ostomy Powder*® e soro fisiológico). As lesões foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente no 7º, 9º e 11º dia de pós-operatório. **Resultados:** 66,6% das lesões tratadas com pó à base de própolis verde e 33,3% das lesões tratadas com o Brava *Ostomy Powder*® cicatrizaram em 11 dias. A análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos ratos não mostrou hepatotoxicidade e evidenciou a atividade anti-inflamatória do pó à base de própolis verde. O produto formulado para este estudo e o comercial mostraram resultados satisfatórios na retração das feridas, angiogênese, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. **Conclusão:** o tratamento com o produto formulado a base de própolis verde mostrou grande potencial de cicatrização das lesões cutâneas agudas.

Palavras-chave: Própolis; Ferimentos e lesões; Cicatrização; Farmacognosia; Estomaterapia.

ABSTRACT

FARIA, T.F. **Healing activity of green propolis extract in the treatment of skin lesions induced in adult *wistar* rats.** 2022. 114 p. Thesis (Doctorate). Department of Nursing, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, Federal District, 2022.

Introduction: The healing process begins after tissue injury of any nature and is considered a complex process that involves chemical, biological and physical phenomena. Propolis is a resin produced by bees and since ancient times it has been used as a medicine to treat skin lesions, due to its healing, antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anesthetic, immunomodulatory, hepatoprotective properties, among others. **Objective:** to evaluate the healing potential of a powder product based on green propolis in acute wounds induced in rats. **Method:** experimental study carried out with 27 rats randomly divided into three predefined groups (treatment, positive control and negative control). The surgical wounds were treated with the products in test (powder based on green propolis, Brava *Ostomy Powder*® and saline). The wounds were analyzed macro and microscopically on the 7th, 9th and 11th postoperative day. **Results:** 66.6% of lesions treated with the powder based on green propolis and 33.3% of lesions treated with Brava *Ostomy Powder*® healed in 11 days. The analysis of the hematological and biochemical parameters of the rats did not demonstrate hepatotoxicity and showed the anti-inflammatory activity of the powder based on green propolis. The product formulated for this study and the commercial product showed satisfactory results in wound retraction, angiogenesis, fibroblast proliferation and collagen synthesis. **Conclusion:** treatment with the product based on green propolis showed great healing potential of skin lesions.

Keywords: Propolis; Skin and injuries; Healing; Pharmacognosy; Enterostomal therapy.

RESUMEN

FARIA, T.F. **Estudio de la actividad cicatrizante del extracto de propóleo verde en el tratamiento de lesiones cutáneas inducidas en ratas *wistar* adultas.** 2022. 114 p. Tesis (Doctorado). Departamento de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Brasilia. Brasilia, Distrito Federal, 2022.

Introducción: El proceso de cicatrización se inicia después de una lesión tisular de cualquier naturaleza y se considera un proceso complejo que involucra fenómenos químicos, biológicos y físicos. El propóleo es una resina producida por las abejas y desde la antigüedad se ha utilizado como medicamento para tratar afecciones de la piel, debido a sus propiedades cicatrizantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, anestésicas, inmunomoduladoras, hepatoprotectora, entre otras. **Objetivo:** evaluar el potencial cicatrizante de un producto en polvo a base de propóleo verde en heridas agudas inducidas en ratas. **Método:** estudio experimental realizado con 27 ratas divididas aleatoriamente en tres grupos predefinidos (tratamiento, control positivo y control negativo). Las heridas quirúrgicas fueron tratadas con los productos en prueba (polvo a base de propóleo verde, Brava *Ostomy Powder*® y solución fisiológica). Las heridas fueron analizadas macro y microscópicamente a los 7, 9 y 11 días postoperatorios. **Resultados:** el 66,6% de las lesiones tratadas con el polvo a base de propóleo verde y el 33,3% de las lesiones tratadas con Brava *Ostomy Powder*® cicatrizaron en 11 días. El análisis de los parámetros hematológicos y bioquímicos de las ratas no mostró hepatotoxicidad y mostró la actividad antiinflamatoria del polvo a base de propóleo verde. El producto formulado para este estudio y el producto comercial mostraron resultados satisfactorios en la retracción de heridas, angiogénesis, proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno. **Conclusión:** el tratamiento con el producto a base de propóleo verde mostró un gran potencial curativo de las lesiones cutáneas.

Palabras clave: Propóleo; Heridas y lesiones; Cicatrización; Farmacognosia; Estomaterapia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas da pele.....	30
Figura 2 - Estruturas da pele por fotomicrografia.....	33
Figura 3 - Camadas papilar e reticular da derme.....	35
Figura 4 - Estrutura do folículo piloso e área adjacente.....	37
Figura 5 - Tríade de avaliação de feridas.....	46
Figura 6 - Fluxograma da busca dos artigos na literatura.....	55
Figura 7 - Caracterização dos artigos com a aplicação de própolis verde na cicatrização de lesões de pele como objeto de estudo.....	56
Figura 8 - Extrato hidroalcolólico de própolis verde à 11%.....	65
Figura 9 - Insumos utilizados na pesquisa.....	66
Figura 10 - Características antioxidantes da própolis <i>in natura</i> , extrato hidroalcolólico de própolis verde à 11% e curativo produzido com o extrato de própolis verde utilizando a tecnologia de <i>Spray Dryer</i>	70
Figura 11 - Confeção das lesões nos ratos e aplicação do produto em pó.....	74
Figura 12 - Aspectos macroscópicos das lesões dos Grupos Controle Negativo (GCN), Tratamento (EP11) e Controle Positivo (GCP).....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Componentes presentes na própolis.....	48
Quadro 2 - Avaliação dos critérios de qualidade metodológica feitas pelo revisor 1, baseada na ferramenta SYRCLE.....	57
Quadro 3 - Avaliação dos critérios de qualidade metodológica feitas pelo revisor 2, baseada na ferramenta SYRCLE.....	58
Quadro 4 - Avaliação das características macroscópicas das lesões.....	74
Quadro 5 - Descrição dos escores de avaliação qualitativa das lâminas histológicas.....	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Correlação entre o comprimento e largura das lesões.....	84
Gráfico 2 - Presença de polimorfonucleados e mononucleados no 7º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®).....	85
Gráfico 3 - Presença de polimorfonucleados e mononucleados no 9º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®).....	86
Gráfico 4 - Presença de polimorfonucleados e mononucleados no 11º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®).....	86
Gráfico 5 - Presença de fibroblastos no 7º, 9º e 11º PO nos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®).....	87
Gráfico 6 - Deposição de colágeno no 7º, 9º e 11º PO nos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®).....	87
Gráfico 7 - Formação dos novos vasos sanguíneos no 7º, 9º e 11º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®).....	88
Gráfico 8 - Enzimas hepáticas dos ratos no GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência.....	89
Gráfico 9 - Análise do hemograma (série vermelha) dos ratos dos grupos GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência.....	90
Gráfico 10 - Análise das plaquetas (série vermelha) dos ratos dos grupos GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência.....	90
Gráfico 11 - Análise do hemograma (série branca) dos ratos dos grupos GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência.....	91
Gráfico 12 - Perfil inflamatório dos animais do GCN, EP11 e GCP.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mensuração do comprimento e largura das feridas em centímetros.....	83
Tabela 2 - Comparação entre as médias das áreas das lesões entre os três grupos estudados.....	84
Tabela 3 - Enzimas hepáticas no plasma dos ratos no GCN, EP11 e GCP.....	88
Tabela 4 - Contagem das células da série vermelha do sangue dos ratos.....	89
Tabela 5 - Contagem das células da série branca do sangue dos ratos.....	91
Tabela 6 - Média e desvio padrão dos parâmetros de perfil inflamatório dos animais do GCN, EP11 e GCP.....	92

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOSDF	Associação dos Ostromizados do Distrito Federal
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CINAHL	<i>The Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature</i>
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DECS	Descritores em Ciências da Saúde
DF	Distrito Federal
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
GCN	Grupo Controle Negativo
GCP	Grupo Controle Positivo
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HET-CAM	<i>Henn's Egg Test-Chorioallantoic Membrane</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IC50	Concentração Inibitória de 50% do radical
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
LTMAC	Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MESH	<i>Medical Subject Headings</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PEAC	Projeto de Extensão de Ação Contínua
PTK	<i>Protein Tyrosine Kinase</i>
PO	Pós-Operatório
PRISMA	<i>Preferred Report Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis</i>
SAEE	Serviço Ambulatorial de Enfermagem em Estomaterapia
SF	Solução Fisiológica
SP	São Paulo
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SOBEST	Associação Brasileira de Estomaterapia
SYRCLE	<i>Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation</i>
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TGF- β	Fator de Crescimento de Transformação- β
UNB	Universidade de Brasília
USP	Universidade de São Paulo
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetros
EAG	equivalente de ácido gálico
EQ	equivalente de quercetina
g	gramas
mg	miligramas
mL	mililitros
mm	milímetros
nm	nanômetro
psi	<i>pound force per square inch</i>

SUMÁRIO

1. PREFÁCIO	21
2. INTRODUÇÃO	24
2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	24
2.2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	26
3. OBJETIVOS	28
3.1 GERAL	28
3.2 ESPECÍFICOS	28
4. REVISÃO DA LITERATURA	30
4.1 SISTEMA TEGUMENTAR	30
4.2 LESÕES DE PELE	37
4.3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	39
4.4 AVALIAÇÃO E O TRATAMENTO DE FERIDAS	44
4.5 PRÓPOLIS	47
4.6 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA	52
5. MATERIAIS E MÉTODO	64
5.1 TIPO DE ESTUDO	64
5.2 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	64
5.2.1 PRIMEIRA ETAPA: TESTES FARMACÊUTICOS	65
5.2.2 SEGUNDA ETAPA: TESTE <i>IN VIVO</i>	71
5.2.3 TERCEIRA ETAPA: COLETA DE AMOSTRA DE SANGUE PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA	76
5.2.4 QUARTA ETAPA: ANÁLISE HISTOLÓGICA	78
5.3 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS	79
6. RESULTADOS	81
6.1 ANÁLISE DO PROCESSO CICATRICIAL	81
6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	85
6.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA	88
6. DISCUSSÃO	94
7. CONCLUSÃO	102
8. REFERÊNCIAS	104
<u>ANEXOS</u>	<u>114</u>
ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	114

Prefácio

1. PREFÁCIO

Ao ingressar no curso de Enfermagem da Universidade de Brasília (UnB), no ano de 2010, tive o primeiro contato com a área de estomaterapia ao conhecer o Projeto de Extensão de Ação Contínua intitulado “Serviço Ambulatorial de Enfermagem em Estomaterapia” (PEAC-SAEE) por meio de outros colegas de graduação que faziam parte deste projeto.

O PEAC-SAEE, criado em 1999, tem como objetivo proporcionar aos acadêmicos de Enfermagem a experiência de prestar cuidados ambulatoriais aos indivíduos com feridas, estomias e incontinências no Hospital Universitário de Brasília (HUB) sob a supervisão de enfermeiros e das professoras coordenadoras do projeto. Os alunos são estimulados a participar das reuniões científicas promovidas pela Associação Brasileira de Estomaterapia (SOBEST) e das reuniões organizadas mensalmente pela Associação dos Ostomizados do Distrito Federal (AOSDF), em que são abordados os assuntos relacionados a esta especialidade. Dado o contexto atual da pandemia do vírus SARS-coV-2 (covid-19), tais reuniões passaram a ocorrer na modalidade *on-line* via plataformas de videoconferência (Microsoft Teams®, *Google Meet*, entre outras) ou redes sociais (*Instagram*, *Youtube* etc.). Atualmente os encontros presenciais foram retomados e ocorrem no auditório da Estação do Metrô da 112 sul.

Como aluna de graduação, permaneci como extensionista do referido projeto do sexto até o décimo semestre, envolvida nas atividades de atendimento aos pacientes sob supervisão e realizando o treinamento teórico oferecido aos novos extensionistas, apresentando brevemente as atividades desenvolvidas no ambulatório, além de atualizar o conhecimento dos alunos em relação a temas específicos vivenciados com maior frequência, como avaliação de feridas, coberturas utilizadas para tratamento de feridas, troca de equipamento coletor de estomias, entre outros, visando a segurança e a qualidade da assistência prestada.

No decorrer da minha formação acadêmica fui bolsista do Programa de Iniciação Científica e a convivência com as professoras Ana Lúcia da Silva e Ivone Kamada durante minha participação como extensionista do PEAC-SAEE foram importantes para que eu escolhesse pesquisar na área de Estomaterapia, tanto no meu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) da graduação quanto no Mestrado que ingressei pelo Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Universidade de Brasília.

Neste contexto, o Processo de Cuidar em Saúde e Enfermagem foi escolhido como linha de pesquisa, assim como a Enfermagem em Estomaterapia com ênfase na população pediátrica como tema para o mestrado, consciente de que poucos estudos abordavam assuntos relacionados a esta parcela da população. A partir dos resultados encontrados no meu estudo concluído em 2016, que mostrou que a dermatite periestoma foi a complicação mais frequente encontrada nas crianças, bem como a minha conclusão do curso de pós-graduação em estomaterapia, optei pela continuidade do estudo sobre o tema no doutorado, visando a criação de uma tecnologia em saúde que pudesse ser utilizada pelas pessoas com estomias e lesões de pele, motivada pelo desejo de contribuir cada vez mais para a área em questão.

Deste modo, espero que os resultados apresentados nesta pesquisa de doutorado possam subsidiar as pesquisas futuras voltadas para o desenvolvimento de produtos para tratamento de lesões de pele, fornecendo informações que contribuam positivamente para a prática dos profissionais de saúde, além de estimular a produção científica acerca da temática abordada.

Introdução

2. INTRODUÇÃO

2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As lesões de pele podem acometer indivíduos de qualquer idade e apresentam gravidade variável. São classificadas como agudas quando ocorrem de maneira abrupta e/ou traumáticas, com ruptura da vascularização do sistema tegumentar que desencadeia o processo imediato de hemostasia do organismo. São lesões que costumam cicatrizar em um tempo menor que as lesões crônicas, a depender do objeto causador da lesão, grau de contaminação e tecidos atingidos (GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; GEOVANINI, 2014).

O processo de cicatrização se inicia após lesão tecidual de qualquer natureza, sendo considerado um processo complexo que envolve fenômenos químicos, biológicos e físicos, composto por estágios que ocorrem de forma simultânea e interdependente, podendo variar de acordo com a estrutura envolvida: na camada mais superficial (epiderme ou porção mais alta da derme), a cicatrização ocorre por regeneração, com proliferação epitelial e migração de células sem perda de sua função; nas lesões de espessura total, ocorre dano na epiderme, derme e hipoderme, podendo acometer outras estruturas mais profundas (músculos, tendões e ossos) e a cicatrização envolve a formação de tecido de granulação, contração e epitelização (BORGES *et al*, 2010).

Produtos naturais derivados de plantas e outras substâncias de origem vegetal ou animal são utilizados pelos seres humanos para fins medicinais, incluindo o tratamento de feridas, devido a fatores como disponibilidade de recurso, baixo custo e diferentes culturas envolvidas (BARACHO *et al*, 2009; NICOLETTI *et al*, 2010). Diversos países, incluindo o Brasil, estão criando leis e normatizando o uso desses produtos, levando em consideração sua eficácia, os critérios de segurança que envolvem sua fabricação e sua qualidade. Tais produtos devem ter seus mecanismos de ação e toxicologia avaliados e comprovados cientificamente, assim como ocorre com outros medicamentos (NICOLETTI *et al*, 2010).

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas e esta palavra deriva do grego *propolis*, que significa defesa da comunidade, sendo utilizada para reparar frestas ou outros danos presentes na colmeia, como defesa contra agentes externos e microrganismos, mumificação de insetos e preparo de ambiente asséptico para a postura da abelha rainha (LUSTOSA *et al*, 2008).

Desde a antiguidade é utilizada como medicamento para tratar afecções cutâneas e possui propriedade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anestésica, imunomoduladora, hepatoprotetora, cicatrizante, entre outras. Os egípcios utilizavam a própolis para embalsamar cadáveres, uma vez que conheciam sua propriedade antiputrefativa; médicos gregos e romanos conheciam suas propriedades medicinais e o extrato de própolis é utilizado na medicina popular desde 300 a.C. Em 1950 a 1960, a própolis começou a ser utilizada como tratamento para problemas de saúde em países do leste europeu. A partir de 1980, a resina começou a se tornar popular na América do Sul e do Norte, em países do oeste da Europa e Japão (BARBOSA *et al*, 2009; LUSTOSA *et al*, 2008).

A composição química da própolis é considerada complexa, uma vez que as abelhas coletam materiais de diversos tipos de plantas, como resinas, pólen, látex e exsudatos de árvores que em contato com a saliva das abelhas e suas enzimas formarão a própolis. Esta sofre alterações em sua composição, em decorrência da localização geográfica e a genética das abelhas que coletam o material (BARBOSA *et al*, 2009).

São descritos mais de 200 elementos na composição química da própolis, entre eles os flavonoides (quercetina, pinocembrina, galangina entre outros), ácidos graxos e fenólicos, vitaminas (C, E, B1, B2 e B6), minerais (ferro, cálcio e manganês), aldeídos aromáticos, cetonas, esteroides, polissacarídeos, álcoois e aminoácidos (BARBOSA *et al*, 2009; OLIVEIRA *et al*, 2012; BATISTA *et al*, 2012). Os flavonoides são os principais componentes da própolis e são considerados os responsáveis pelo seu efeito cicatrizante, atuando como antioxidante e antimicrobiano, exercendo função imunomoduladora (ativando a glândula timo e promovendo a atividade fagocítica, bem como estimulando a imunidade celular), anti-inflamatória e favorecendo a ação e absorção de vitaminas (BARBOSA *et al*, 2009; BATISTA *et al*, 2012; OLIVEIRA *et al*, 2012).

Revisões integrativas da literatura demonstram evidências da atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e leveduras, além da atividade anti-inflamatória e cicatrizante da própolis. Os resultados apresentados nas revisões de literatura são considerados satisfatórios, mas não oferecem níveis de evidência suficientes para a recomendação do uso da própolis na prática clínica, revelando a necessidade da elaboração de estudos nesta área. Os estudos possuem metodologia pouco clara e algumas limitações, como por exemplo, apresentação de dados parciais de estudos experimentais, comparação da própolis apenas com um placebo (sem utilizar o controle positivo), utilização de amostras

reduzidas e sem randomização, seleção de pacientes com lesões de diversas etiologias no mesmo estudo sem descrição do controle dos fatores causais, são divergentes em relação à concentração da própolis na formulação, além de não realizarem a comparação direta entre esta concentração e a cicatrização das lesões estudadas (BARBOSA *et al*, 2009; BORGES; RIBEIRO; DONOSO, 2011).

Deste modo, torna-se essencial que os profissionais de saúde, em especial os enfermeiros, compreendam o fenômeno que envolve as lesões de pele e suas especificidades, buscando as melhores evidências científicas para o tratamento das feridas, visando não somente a adesão às intervenções por parte dos pacientes e equipe de saúde, mas também colaborando para a melhora da qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

Considerando a complexidade que envolve o tratamento das diferentes etiologias de lesões de pele, surgiu o seguinte questionamento: o uso tópico da própolis verde é efetivo na cicatrização de feridas agudas?

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver um produto à base de própolis verde para o tratamento de lesões de pele induzidas cirurgicamente em animais e comparar sua eficácia com outro produto disponível comercialmente e utilizado para a mesma finalidade.

2.2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O tratamento das lesões de pele configura enorme desafio para os profissionais de saúde, dado o impacto socioeconômico que causam para os indivíduos acometidos, seus familiares e serviços de saúde. Para o gerenciamento de lesões é necessário conhecimento científico por parte do profissional e a aplicação de intervenções adequadas, além do conhecimento sobre a variedade dos produtos e dispositivos adjuvantes disponíveis para esta finalidade (DOMANSKY; BORGES, 2012).

Este estudo justifica-se pela necessidade de desenvolvimento de uma formulação farmacêutica à base de própolis verde considerada estável, segura e eficaz para o tratamento de lesões de pele *in vivo*, visando uma posterior utilização deste recurso em seres humanos.

Pretende-se que o produto desenvolvido a partir desta pesquisa seja futuramente uma opção de tratamento de lesão de pele para a população em geral, incluindo as pessoas com estomias.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Avaliar a eficácia do extrato de própolis verde na cicatrização de lesão de pele induzida em ratos adultos da linhagem *Wistar*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento, por meio de artigos científicos, dos níveis de evidência disponíveis sobre o uso do extrato de própolis para a cicatrização de lesões de pele.
- Desenvolver uma formulação contendo extrato de própolis verde com concentração segura, avaliando sua estabilidade a partir de características físico-químicas e microbiológicas.
- Verificar e comparar os efeitos da formulação contendo extrato de própolis com o Brava *Ostomy Powder*® no tratamento de lesão de pele induzida em ratos.
- Realizar a avaliação histológica da lesão de pele tratada com o produto à base de extrato de própolis e a resina sintética em pó para estomias (*Brava Ostomy Powder*®) nos ratos adultos da linhagem *Wistar*.
- Realizar a avaliação bioquímica do produto contendo o extrato de própolis verde criado para este estudo em comparação ao produto comercial.

Revisão da Literatura

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 SISTEMA TEGUMENTAR

O sistema tegumentar é um órgão complexo, especializado e multifuncional, podendo atingir até 2m² de um adulto e representando 8 a 16% do peso corporal. É composto por duas camadas, sendo uma mais externa, conhecida como epiderme (formada por tecido epitelial de origem embrionária ectodérmica); uma camada interna, conhecida como derme, que tem origem embrionária mesodérmica (DEALEY, 2008; YAMADA, 2015).

Unhas, pelos, glândulas sudoríparas e sebáceas, além dos folículos pilosos também fazem parte do sistema tegumentar, sendo consideradas estruturas anexas. A hipoderme (fáscia superficial) faz a junção entre a pele e as estruturas mais profundas, como músculos, ossos e outros órgãos (GARTNER, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; PAWLINA, ROSS, 2020).

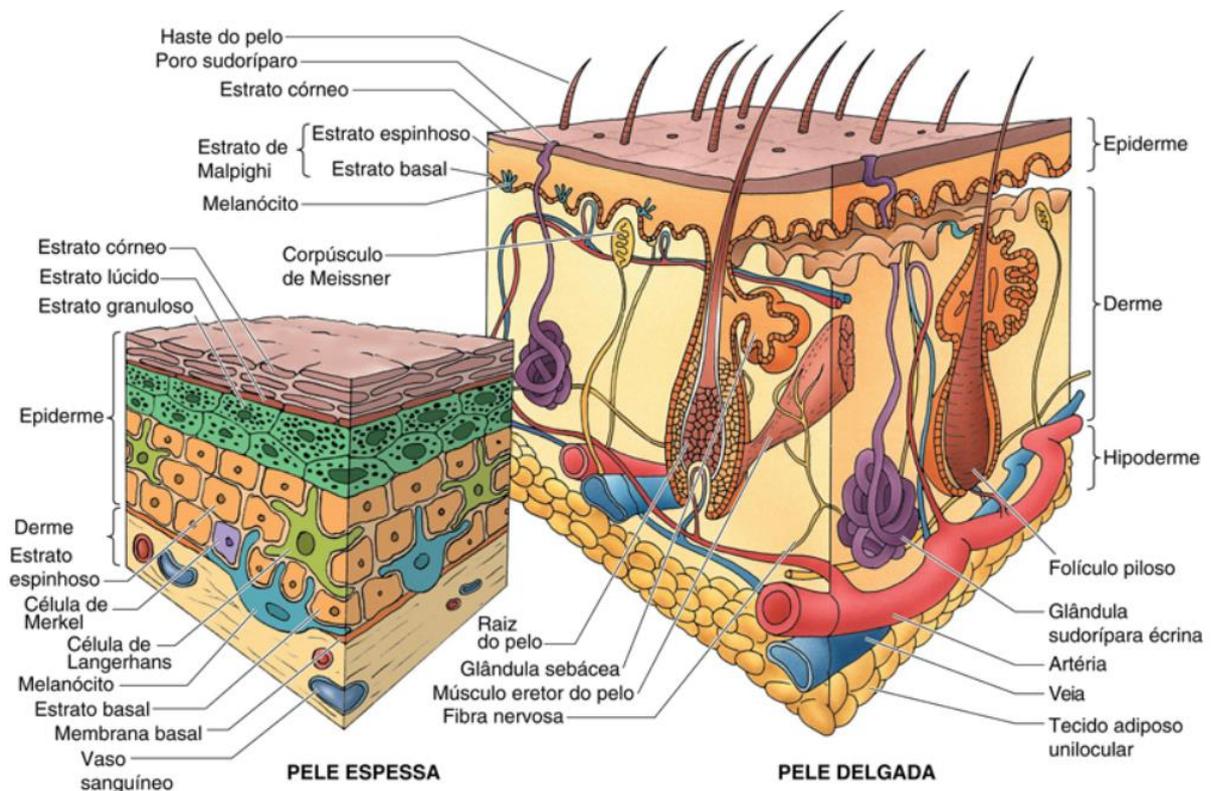


Figura 1 - Estruturas da pele.

Fonte: GARTNER, 2017.

A pele humana é considerada um revestimento de proteção contra agentes físicos, biológicos, térmicos, químicos e a radiação solar, tendo como funções principais a

termorregulação, percepção sensorial, absorção, transpiração e perspiração, homeostase, nutrição e imunidade (GEOVANINI, 2014).

Para manutenção de sua integridade é importante que sejam avaliados fatores como idade, nutrição e metabolismo, peculiaridades e alterações a depender da região que a pele reveste, comorbidades (ex.: doenças crônicas), uso prolongado de medicamentos que diminuem ou inibem a produção de fibroblastos (ex.: anti-inflamatórios não-esteroidais, corticoides) e o pH, que também diferem de um local para outros (BORGES et al, 2010; YAMADA, 2015).

4.1.1 Epiderme

O tecido epitelial forma a camada da pele conhecida como epiderme e deriva do ectoderma e endoderma. O ectoderma dá origem aos epitélios de revestimento da córnea, mucosa oral e nasal, epiderme e suas glândulas associadas. O revestimento epitelial do trato gastrointestinal e respiratório são originados pelo endoderma (GARTNER, 2017).

A epiderme é a camada mais superficial e fina do sistema tegumentar, constituída por células poliédricas e justapostas, de formato colunar ou pavimentoso, aderidas firmemente por meio de junções intercelulares. O epitélio se organiza como folhetos, revestindo superfícies internas ou externa (ex.: pele), cavidades do corpo e unidades secretoras. A forma do núcleo das células epiteliais geralmente acompanha o formato da célula, podendo apresentar formato esférico, elíptico ou alongado. Esta avaliação permite determinar, via microscopia ótica, se as células estão organizadas em uma única camada ou em várias (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

O epitélio estratificado pavimentoso queratinizado compõe a epiderme e as células mais abundantes são os queratinócitos, tornando-a resistente à atritos intensos e impermeável à água. Apresenta várias camadas de células que, ao chegar à superfície, tornam-se anucleadas devido ao preenchimento total de filamentos de citoqueratina no citoplasma. Observa-se ainda na epiderme a presença de outras células como melanócitos, células de *Langerhans* e *Merkel* (GARTNER, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; PAWLINA, ROSS, 2020).

Os melanócitos apresentam citoplasma globoso com prolongamentos que conseguem penetrar as camadas basal e espinhosa, transferindo grânulos de melanina para estas estruturas da epiderme. Se prendem à camada basal por meio de hemidesmossomos e, ao produzirem melanina (com auxílio da enzima tirosinase), seus grânulos são injetados no citoplasma dos

queratinócitos e posicionam-se na porção supranuclear, conferindo proteção máxima ao ácido desoxirribonucleico (DNA) destas células contra os efeitos da radiação solar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

As células de Langerhans possuem muitos prolongamentos e se localizam entre os queratinócitos na camada espinhosa da epiderme. São células móveis, transportadas pelo sangue circulante e participam da defesa imunológica da pele, captando antígenos, processando-os e apresentando aos linfócitos T. As células de Merkel são mecanorreceptores, responsáveis pela sensibilidade tátil, localizadas na camada basal e unidas aos queratinócitos com auxílio dos desmossomos. São encontradas em maior quantidade na palma das mãos e planta dos pés, mucosa oral e na base dos folículos pilosos. Na base das células de Merkel são inseridas fibras nervosas aferentes, que conduzem o estímulo ao Sistema Nervoso Central (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

A espessura e estrutura da epiderme variam de acordo com sua localização, sendo mais espessa na palma das mãos, planta dos pés e em algumas articulações. Estima-se que a epiderme humana se renove a cada 15 ou 30 dias por meio de mitose celular que ocorre na camada basal, dependendo da idade da pessoa e de onde se localiza. É composta por cinco camadas, que serão descritas a seguir (GARTNER, 2017; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

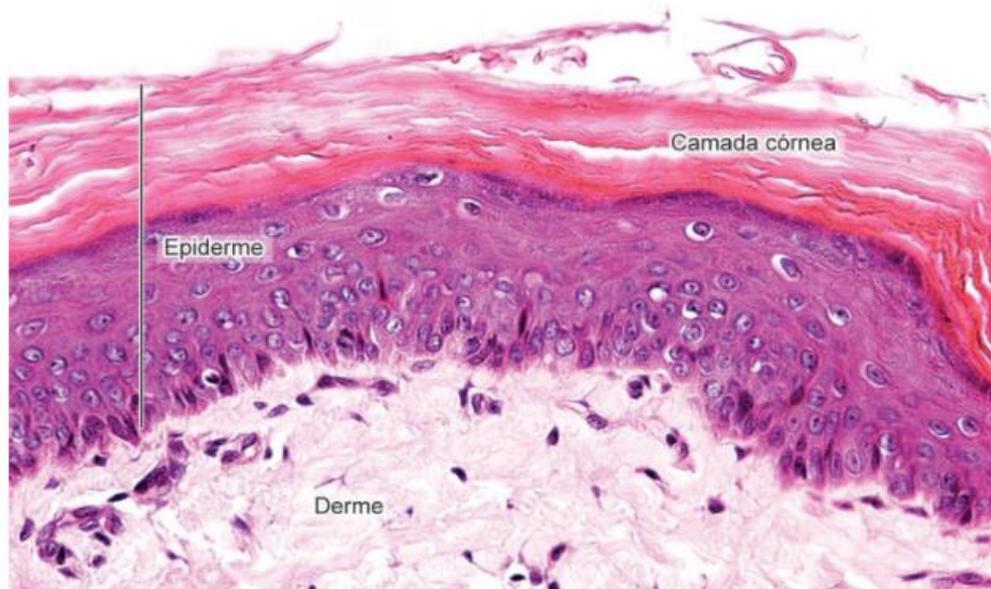


Figura 2 – Estruturas da pele por fotomicrografia.
Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018.

A camada basal, também conhecida como camada germinativa, apresenta células prismáticas ou cuboides, levemente basófilas, que separam a epiderme da derme, pois repousam sobre a membrana basal. Os queratinócitos possuem filamentos intermediários de queratina que se tornam mais numerosos à medida que as células avançam para a superfície, formando a camada córnea. Fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), ligantes para o receptor do fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento de fibroblastos 7 e 10 (FGF-7 e FGF-10), assim como os fatores mitóticos dos fibroblastos presentes na derme são importantes para a proliferação celular na camada basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; PAWLINA; ROSS, 2020).

A camada espinhosa é constituída por células cuboides ou levemente achatadas, com núcleo central e citoplasma que contém tonofilamentos (filamentos de queratina), produzindo volume maior que as células da camada basal. Os desmossomos são junções intercelulares que aproximam estas células, dando a elas um aspecto espinhoso. Os filamentos de queratina e os desmossomos são responsáveis por manter a coesão entre as células da epiderme e conferem a resistência desta estrutura ao atrito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

A camada granulosa contém células poligonais achatadas, com núcleo central e citoplasma com presença de grânulos basófilos (grânulos de querato-hialina), que são importantes para a condensação de tonofilamentos (etapa anterior à formação da camada córnea). As células da camada granulosa também apresentam grânulos lamelares (de espessura entre 0,1 e 0,3 mm), formados por bicamadas lipídicas envoltas por membranas que se fundem com a membrana plasmática, expulsando seu conteúdo para o espaço intercelular, onde há depósito de material lipídico, contribuindo assim para a formação da barreira contra a penetração de substâncias. Este fator torna a pele impermeável (principalmente à água) e impede a desidratação do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

A camada lúcida é constituída por células achatadas, eosinófilas, translúcidas, que conferem uma característica delgada, onde os núcleos e organelas citoplasmáticas desapareceram porque foram digeridos pelos lisossomos. O citoplasma apresenta filamentos de queratina abundantes e ainda é possível ver desmossomos entre as células, sendo esta camada mais evidente na pele espessa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

A última camada, conhecida como camada córnea, é formada por células achatadas, mortas e sem núcleo, com citoplasma cheio de queratina. Nessa camada, os tonofilamentos se

aglutinam junto com a matriz formada pelos grânulos de querato-hialina, modificando sua composição conforme os queratinócitos se diferenciam. Na diferenciação, os queratinócitos se transformam em placas sem vida, descamando continuamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

4.1.2 Derme

A derme é derivada do mesoderma e composta por tecido conjuntivo frouxo e denso não modelado, apresentando espessura que varia de acordo com a região anatômica analisada (pode chegar à 3mm na planta dos pés). Esta camada é essencial para a nutrição da epiderme que não é vascularizada e seus vasos sanguíneos são importantes para a função de termorregulação do organismo, além da defesa imunológica e sensibilidade, como temperatura, tato e dor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

A derme une o sistema tegumentar à outras estruturas, como a hipoderme (ou tecido subcutâneo). Divide-se em duas camadas, conhecidas como derme papilar e reticular. A camada papilar é delgada e constituída por tecido frouxo, formando as papilas dérmicas. Apresenta fibrilas de colágeno (tipo I e II) e as fibrilas de ancoragem (colágeno tipo IV), que prendem a derme às camadas mais superficiais do sistema tegumentar, além dos pequenos vasos sanguíneos (capilares) que nutrem e oxigenam a epiderme, auxiliando também no processo de termorregulação. Macrófagos, plasmócitos e fibroblastos, assim como outras células do tecido conjuntivo estão presentes nesta camada da derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

A camada reticular é formada por tecido denso, tornando-a mais espessa do que a camada papilar. Esta camada apresenta fibras elásticas entremeadas com fibras de colágeno tipo I, responsáveis pela elasticidade da pele, bem como vasos sanguíneos, linfáticos e nervos. Nesta camada estão presentes ainda, em menor número, os fibroblastos, as células de defesa (macrófagos, linfócitos e os mastócitos) e células adiposas, principalmente na porção próxima à hipoderme. Outras estruturas também estão presentes na derme, como folículos piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas, conferindo o contorno irregular da derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017; PAWLINA, ROSS, 2020).

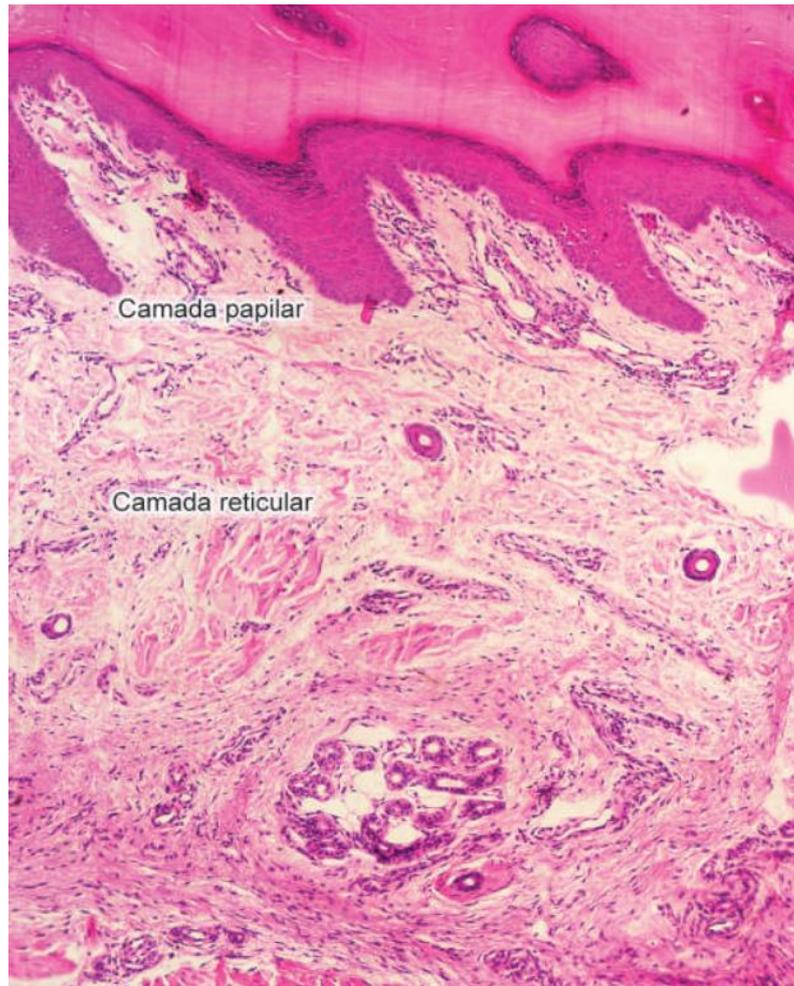


Figura 3 – Camadas papilar e reticular da derme.
Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018.

As glândulas sebáceas possuem células acinosas, formadas por uma camada de células epiteliais achatadas apoiadas em uma membrana basal, produzindo secreção lipídica. Quando estas células morrem e se rompem, formam a secreção sebácea. Os ductos das glândulas sebáceas formam outros ductos que desembocam nos folículos pilosos. Algumas regiões como as palmas das mãos e plantas dos pés não possuem glândulas sebáceas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

Glândulas sudoríparas são encontradas em todo o sistema tegumentar, exceto na glândula. São formadas por túbulos enovelados, que possuem ductos que se abrem na superfície da pele, além de células claras e escuras responsáveis pela produção de glicoproteínas e a parte aquosa do suor. O suor é uma solução diluída composta por sódio, potássio, poucas proteínas, cloreto, ácido úrico, ureia e amônia, que evapora ao alcançar a superfície da pele, contribuindo para reduzir a temperatura corporal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

4.1.3 Hipoderme

A hipoderme une o sistema tegumentar aos órgãos subjacentes e mais profundos, sendo responsável também pelo deslizamento da pele sobre as estruturas em que se apoia. É formada por tecido conjuntivo frouxo que, a depender do estado nutricional do organismo e região, pode apresentar uma camada de células adiposas variável que modela o corpo, protege contra temperaturas baixas (isolante térmico) e serve de reserva energética (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

Nos adipócitos estão depositados os triglicerídeos ou triacilgliceróis (TAG), resultado da ligação de glicerol e ácidos graxos essenciais. Desta ligação resulta a gordura neutra, que é apolar, insolúvel em água e hidrofóbica, podendo ser metabolizada para servir como fonte de energia para o organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

4.1.4 Anexos

Os pelos possuem variação de cor, tamanho e disposição a depender da área de sua localização e cor da pele. Podem ser encontrados em quase toda a superfície corporal e essas estruturas são queratinizadas e delgadas, originadas de uma invaginação da epiderme, possuindo uma fase de crescimento intercalada com a fase de repouso, cuja duração também é variável (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

Os folículos pilosos, na fase de crescimento, apresentam uma dilatação terminal conhecida como bulbo piloso e uma papila dérmica localizada no centro da estrutura. A raiz do pelo é formada pelas células que envolvem a papila dérmica, de onde surgem o eixo do pelo. A espessura do pelo varia de acordo com sua localização e são influenciados pela produção hormonal. Os músculos eretores dos pelos se encontram na camada papilar da derme, puxando o pelo para a posição vertical quando contraídos. A cor do pelo depende dos melanócitos que estão localizados entre a papila e o epitélio da raiz, fornecendo melanina às células do córtex e medula do pelo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018).

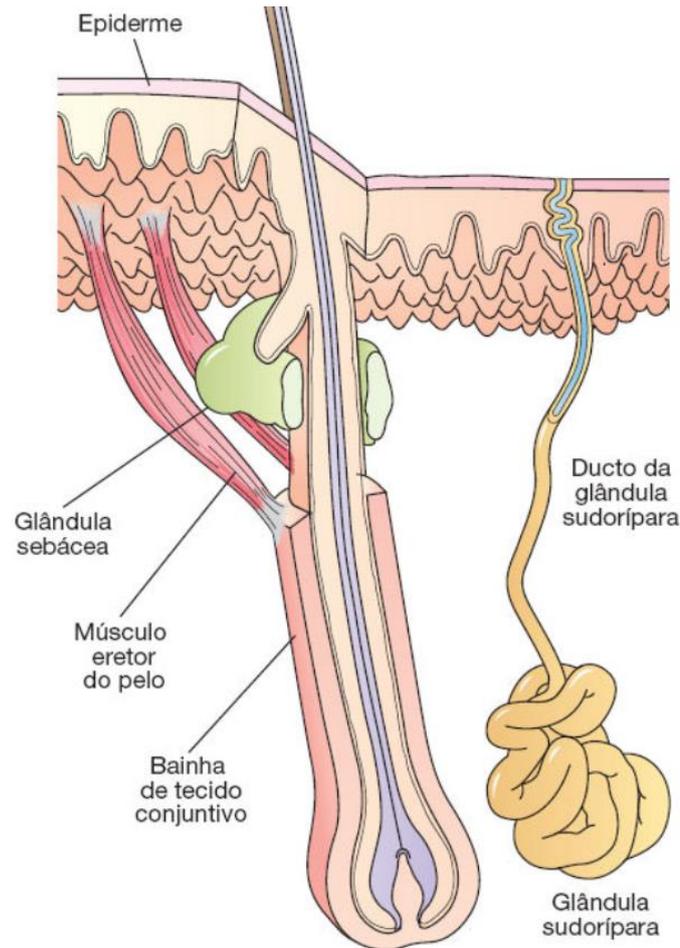


Figura 4 – Estrutura do folículo piloso e área adjacente.
 Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018.

As unhas são formadas por placas de queratina e sua porção final é conhecida como raiz da unha, recoberta por tecido epitelial (cutícula da unha). As placas de queratina são originadas por um processo de proliferação e diferenciação das células epiteliais, formando escamas fortemente aderidas que deslizam sobre o leito ungueal. As unhas crescem em torno de 0,9mm por semana e sua matriz fica recoberta por uma camada estreita de queratina, conhecida como eponíquio ou cutícula. Sua transparência e espessura fina permitem a avaliação dos pequenos vasos sanguíneos da derme presentes na porção dorsal das falanges distais dos dedos e, por este motivo, é possível a mensuração dos parâmetros de oxigenação sanguínea pelas unhas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

4.2 LESÕES DE PELE

As características normais da pele e sua integridade podem variar ao longo da vida, influenciados por fatores como idade, hidratação, nutrição, tabagismo, uso de medicamentos e

tensoativos, exposição aos raios solares, comorbidades (ex.: hipertensão arterial, diabetes *mellitus*), entre outros, predispondo os indivíduos ao surgimento de lesões de pele (DOMANSKY; BORGES, 2012; GEOVANINI, 2014).

Lesões de pele são caracterizadas por alterações estruturais e fisiológicas no sistema tegumentar que podem gerar solução de continuidade superficiais ou profundas em qualquer parte do corpo. Apresentam características e tamanhos variáveis, além de etiologias diversas, causadas por traumas, pressão, patologias, iatrogenias ou ações intencionais (GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; GEOVANINI, 2014; LIMA *et al*, 2018).

Sabe-se que os dados estatísticos relacionados às lesões agudas e crônicas no Brasil são escassos, devido à subnotificação e/ou precariedade dos registros pelas instituições de saúde. Apesar disso, tanto as feridas agudas quanto as crônicas ainda são consideradas um problema de saúde pública e requerem atendimento com olhar crítico, embasado em evidências científicas por parte dos enfermeiros em conjunto com a equipe multidisciplinar (LIMA *et al*, 2018; ALBUQUERQUE; ALVES, 2011).

As lesões agudas são caracterizadas por início súbito e sem complicações relacionadas ao processo cicatricial, podendo ser intencionais (ex.: feridas cirúrgicas) ou traumáticas (mordeduras, queimaduras, lacerações, escoriações etc.). Podem apresentar bordas regulares ou irregulares e o grau de contaminação, acometimento tecidual, bem como o objeto causador da lesão podem influenciar diretamente na cicatrização deste tipo de lesão (DEALEY, 2008; GEOVANINI, 2014).

As feridas cirúrgicas são realizadas a depender da necessidade de uma terapêutica específica e sob condições assépticas, com uso de materiais cortantes afiados e esterilizados para reduzir a agressão aos tecidos no momento da realização do procedimento, facilitando assim a união das bordas e diminuindo o risco de complicações. Podem atingir apenas as camadas da pele ou estruturas mais profundas, como músculo, cavidades e órgãos, dependendo do procedimento cirúrgico executado (GEOVANINI, 2014; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

As lesões podem ainda ser classificadas quanto ao grau de contaminação, sendo consideradas feridas limpas aquelas localizadas em sítios limpos ou de fácil descontaminação, sob condições assépticas durante o procedimento cirúrgico. As feridas contaminadas são aquelas ocasionadas por trauma ou cirurgia, que permanecem abertas por seis horas ou mais,

com presença considerável de microrganismos sem causar sinais e/ou sintomas de infecção. As lesões consideradas colonizadas são crônicas e apresentam microrganismos em sua superfície, que não chegam a produzir sinais de infecção, mas podem retardar o processo cicatricial. As lesões infectadas possuem alta carga de microrganismos que produzem infecções locais ou sistêmica, atrasando o processo de cicatrização e requerendo um manejo adequado por parte dos profissionais de saúde envolvidos no cuidado, porque pode apresentar biofilme no leito da lesão, sinais flogísticos locais, exsudação em moderada a grande quantidade, odor, entre outros (GEOVANINI, 2014).

Independente da etiologia e classificação do tipo de ferida, cabe destacar a importância dos enfermeiros na avaliação das lesões, uma vez que este é um fator essencial para a escolha do tratamento mais adequado. A eficácia do tratamento depende, entre outros fatores, do conhecimento do profissional sobre as melhores evidências e produtos disponíveis, bem como das características fisiopatológicas das lesões e das etapas processo cicatricial (DOMANSKY; BORGES, 2012), que serão discutidos a seguir, por serem fatores que podem interferir direta e indiretamente na resposta ao tratamento.

4.3 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

A cicatrização de feridas é considerada uma atividade complexa porque envolve vários processos celulares contínuos e conectados entre si, que contribuem para a restauração do tecido lesionado. Conforme a intensidade do trauma, as lesões provocadas podem ser de espessura parcial, quando atingem apenas as estruturas como a epiderme ou a parte superficial da derme; ou de espessura total, quando ocorre perda total da pele, podendo atingir também as estruturas mais profundas como tecido subcutâneo, fáscia, músculos, tendões e ossos (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

As feridas cirúrgicas podem cicatrizar por primeira, segunda ou terceira intenção. Na cicatrização por primeira intenção, são utilizados fios de sutura ou outros materiais para união das bordas da lesão. Na cicatrização por segunda intenção, como há uma perda acentuada de tecido com maior afastamento das bordas, a lesão é mantida aberta para fechar por meio de formação de tecido de granulação e epitelização. Já na cicatrização por terceira intenção, também conhecida como fechamento primário retardado, a ferida fica aberta por um período e, posteriormente, realiza-se a sutura das bordas para continuidade do processo cicatricial (BORGES *et al*, 2010; GEOVANINI, 2014).

As fases da cicatrização de feridas se dividem didaticamente em três: inflamatória, regenerativa e reparadora. Na fase inflamatória, que ocorre quando há a lesão até 3 ou 4 dias após o evento, observa-se inicialmente uma vasoconstrição de duração rápida (cinco a vinte minutos), onde o endotélio lesionado produz endotelina para contrair o músculo liso e ocasionar a interrupção da hemorragia e redução da exposição local aos microrganismos. Em seguida, verifica-se o aumento da permeabilidade capilar, liberação de mediadores bioquímicos (ex.: histamina, prostaglandinas, bradicinina, tromboxanos etc.) e migração de células de defesa (neutrófilos e macrófagos) para o leito da ferida, visando a remoção dos microrganismos e o auxílio no processo de reparação tecidual. Nessa fase é possível observar a presença de sinais e sintomas inflamatórios, como edema, dor, hiperemia e calor (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; MEDEIROS; FILHO, 2016).

A resposta inflamatória é mediada pelo sistema complemento, sistema de coagulação e as cininas. O sistema complemento é ativado por complexos antígeno-anticorpo e, ao ser acionado, gera um aumento da permeabilidade vascular permitindo o extravasamento de plasma para o local da lesão e a migração das células de defesa. O sistema de coagulação é responsável pela formação de fibrina, que auxilia na formação de coágulo para interromper o sangramento local, evita a disseminação de microrganismos e corpos estranhos, além de formar uma rede que favorece a migração dos fibroblastos. O grupo cinina, associado a prostaglandina, também aumenta a permeabilidade vascular, permitindo que os leucócitos e os nutrientes cheguem até o tecido lesionado através do fluxo sanguíneo (BORGES *et al*, 2010; MEDEIROS; FILHO, 2016).

Na fase regenerativa ou proliferativa, ocorre a síntese e deposição de colágeno, formação de novos vasos (angiogênese), formação do tecido de granulação, contração da ferida e reepitelização. Pode durar de um a 14 dias e observa-se a migração de células (fibroblastos) das margens para o centro da lesão, atraídos pelos fatores de crescimento produzidos pelos macrófagos. Os fibroblastos produzem colágeno, elastina e proteoglicanos, que são substâncias importantes para a reparação do tecido conjuntivo e manutenção da sua integridade (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; MEDEIROS; FILHO, 2016).

O colágeno é uma proteína não conjugada e fibrosa, formada por moléculas de tropocolágeno (três cadeias de polipeptídios unidos em formação helicoidal), responsável pelo preenchimento do espaço da lesão. As fibras de colágeno normalmente aparecem em quatro a

5 dias após o trauma, dando origem a uma estrutura densa e consistente com cadeias peptídicas de lisina, prolina, glicina, alanina, hidroxilisina e hidroxiprolina (BORGES *et al*, 2010; OLIVEIRA; SILVA; PINTO, 2021). Os fibroblastos dependem de oxigênio e nutrientes (aminoácidos, vitamina C, entre outros) para sintetizar colágeno, que formam o tecido de granulação que é composto também por macrófagos, novos capilares, ácido hialurônico e matriz de fibronectina (BORGES *et al*, 2010).

Diversos tipos de colágeno podem ser encontrados nos diferentes sistemas, como tegumentar, esquelético, vascular (endotélio), entre outros, variando conforme sua estrutura molecular, composição de aminoácidos, comprimento, concentração e localização. Os colágenos tipo I e III são os mais abundantes e encontrados no tecido conjuntivo. Na derme, observa-se a presença de aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20% de colágeno tipo III (OLIVEIRA; SILVA; PINTO, 2021; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2018; GARTNER, 2017).

Cabe destacar que a resistência do colágeno e a sua insolubilidade variam entre os tecidos e o tempo, considerando que o processo cicatricial não se encerra ao final da síntese de colágeno, continuando durante a fase reparadora. Outra etapa da fase regenerativa consiste na epitelização, iniciada ainda quando o tecido de granulação está se formando, crescendo na ferida também a partir das bordas da lesão. Migram sobre o leito úmido da ferida e tecidos viáveis, tendo sua atividade mitótica controlada por uma proteína conhecida como chalcona. A última etapa da fase regenerativa é observada através da contração da ferida (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

A fase reparadora se inicia do terceiro ao 21º dia após a lesão e pode continuar por vários meses ou anos, até que ocorra a remodelagem e fortalecimento das fibras de colágeno após a redução da densidade celular e vascularização. A matriz se reorganiza e há o acúmulo de grandes feixes de colágeno, aumentando a resistência do tecido e diminuindo a espessura da cicatriz (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

Durante as primeiras semanas de cicatrização, o tecido formado é delicado e possui cerca de 10% da força normal da pele. No final da cicatrização, apenas aproximadamente 80% da força anterior é recuperada e o tempo necessário para alcance da elasticidade varia com o tipo de lesão e o fator que gerou o trauma. O excesso de colágeno produzido pode gerar uma cicatriz hipertrófica; já o excesso de colagenase produzida na fase proliferativa pode gerar uma cicatriz frágil e que se rompe com facilidade (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

Considera-se uma ferida cicatrizada aquela que o processo de maturação consegue restabelecer a continuidade da superfície do sistema tegumentar, com força suficiente para que não haja o rompimento (BORGES *et al*, 2010). Dado que as fases de cicatrização são as mesmas para todos os indivíduos, sua evolução depende de fatores locais e sistêmicos, assim como da técnica e a cobertura utilizadas pelo profissional.

4.3.1 Fatores que interferem no processo de cicatrização

A reparação tecidual requer um ambiente propício para a angiogênese, síntese de colágeno, contração da ferida e epitelização. Fatores sistêmicos como a idade, doenças crônicas, alterações nutricionais, tabagismo, uso de alguns medicamentos, bem como os fatores locais como presença de infecção, tecido desvitalizado, corpos estranhos, localização da lesão, edema, entre outros, podem interferir direta e indiretamente no processo de reparação tecidual (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

Fatores sistêmicos

As células do sistema tegumentar sofrem alterações com o envelhecimento. A pele torna-se mais frágil, uma vez que sua elasticidade e espessura diminuem. Há também a redução dos capilares sanguíneos e das terminações nervosas. As células de defesa respondem com menor intensidade e a resposta inflamatória inicial ocorre de maneira lentificada, retardando o processo de cicatrização (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

O tabagismo é responsável pela redução do aporte de oxigênio para os tecidos, uma vez que a nicotina causa vasoconstrição periférica e, conseqüentemente, diminui o aporte de nutrientes e o número de hemoglobinas funcionantes, interferindo na reparação dos tecidos lesionados (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

As doenças crônicas, como hipertensão arterial sistêmica e diabetes *mellitus*, também afetam o aporte de nutrientes aos tecidos, porque o fluxo sanguíneo e as células de defesa se alteram, interferindo assim na angiogênese e reduzindo a capacidade dos fibroblastos sintetizarem colágeno (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

As alterações nutricionais, como deficiência de proteínas, obesidade, hipoalbuminemia e carência de vitaminas deprimem o sistema imune e interferem na síntese de colágeno. O indivíduo obeso tem um aporte de oxigênio e nutrientes reduzido, devido ao acúmulo de gordura no tecido subcutâneo. A deficiência de proteínas é responsável pela diminuição da

resposta inflamatória e imunológica, dificultando também o aumento da resistência do tecido de granulação durante o processo de reparação. A hipovitaminose, principalmente das vitaminas A e C, interferem diretamente na síntese de colágeno e reduzem a migração das células de defesa para a ferida, além de reduzir a resposta inflamatória do organismo, inibindo a contração e a epitelização. O ideal é que se mantenha o consumo adequado diário de carboidratos, proteínas, vitaminas (A, C, D e B) e gorduras para manutenção da integridade da pele (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; DOMANSKY; BORGES, 2012).

O uso de medicamentos, como corticosteroides, anti-inflamatórios, quimioterápicos e radioterápicos, entre outros, interferem na síntese proteica ou divisão celular, limitam a angiogênese, diminuem a resposta imune, interferem na síntese de prostaglandinas e aumentam a atividade da enzima colagenase, retardando o processo de cicatrização e deixando o tecido cicatrizado mais frágil (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; DOMANSKY; BORGES, 2012).

Fatores locais

A presença de fungos, bactérias gram-positivas e negativas podem causar infecção nas feridas e/ou provocar sintomas sistêmicos nos indivíduos acometidos. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* são os microrganismos comumente encontrados nas lesões infectadas (BORGES *et al*, 2010; SANTOS *et al*, 2016; LIMA *et al*, 2021).

O biofilme pode ser encontrado em feridas agudas e crônicas, formando-se a partir da organização das bactérias em comunidades estruturadas, formando matrizes poliméricas que podem ser visíveis a olho nu, caracterizadas por uma fina camada transparente no leito da lesão ou visíveis por microscopia eletrônica (SILVA *et al*, 2018). Wolcott e Rhoads (2008) realizaram um estudo para avaliar o biofilme em feridas, observando sua presença em 60% das feridas crônicas e em 6% das feridas agudas. Concluiu-se que o biofilme contribui para o retardo no processo cicatricial e, conseqüentemente, para a cronicidade das lesões de pele.

O processo infeccioso e/ou colonização crítica na lesão interferem na atividade dos fibroblastos, além de estimular a liberação de lisoenzimas pelos leucócitos que provocam a destruição das células de colágeno e, por conseguinte, prolongam o tempo de cicatrização. Considera-se uma colonização crítica quando há falha no processo cicatricial sem que se observe sinais de infecção, devido à presença de bactérias que se replicam no tecido de

granulação, competindo por oxigênio e nutrientes, além de produzir proteases e citocinas inflamatórias (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; KHEIT, 2003; FALANGA, 2004).

Diversos elementos predisõem o surgimento de infecção na lesão, como a condição clínica da pessoa com ferida (imunossupressão, uso de medicamentos, doenças crônicas, redução da perfusão tecidual), bem como a localização da lesão, higiene precária do paciente e/ou ambiente, institucionalização prolongada, uso indiscriminado de antimicrobianos, falta de insumos básicos para a realização do curativo, entre outros (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; GEOVANINI, 2014).

O excesso de líquido intersticial, observado na presença do edema, cria um ambiente desfavorável para a proliferação das células e síntese de colágeno, além de reduzir a perfusão local devido ao aumento de dióxido de carbono e baixa concentração de oxigênio, podendo levar proliferação de microrganismos e necrose celular. O tecido desvitalizado, como por exemplo a necrose, atua como meio de cultura que favorece o crescimento bacteriano, interfere na resposta leucocitária e aumenta a permeabilidade capilar para absorção de toxinas, diminuindo a síntese de colágeno (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

Corpos estranhos, como grãos de areia, terra, fios de gaze ou sutura, implantes, válvulas artificiais, materiais de síntese ou próteses, entre outros, também podem retardar o processo de cicatrização de lesões e predispor os indivíduos à infecção local e/ou sistêmica (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

4.4 AVALIAÇÃO E O TRATAMENTO DE FERIDAS

A avaliação de feridas exige do enfermeiro amplo conhecimento sobre as fases de cicatrização das feridas, produtos disponíveis no mercado e resposta dos indivíduos ao tratamento, compreendendo a integralidade das ações implementadas. Diversos instrumentos validados podem ser utilizados para auxiliar os profissionais durante a avaliação das lesões, seja de etiologia específica ou generalizada (GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; CARDINELLI *et al*, 2021).

Cuzzel propôs em 1988 um sistema de avaliação de feridas que cicatrizam por segunda intenção, conhecido como sistema RYB (*Red/Yellow/Black Wound Classification System*), classificando as vermelhas como áreas doadoras de enxerto, feridas pós-desbridamento e aquelas em que predominam o tecido de granulação e/ou epitelização. As amarelas são as

feridas que apresentam esfacelo, presença de exsudato e sinais clínicos de infecção. As pretas são aquelas em que observa a necrose de coagulação, cuja coloração também pode variar entre o castanho e marrom; há presença de desnaturação e aumento das fibras colágenas. Sabe-se que tal sistema pode não ser um parâmetro preciso de avaliação uma vez que as feridas podem ter diferentes combinações de colorações. Desta forma, associa-se esse sistema de avaliação a outras ferramentas para melhor caracterização das feridas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A Ferramenta TIME, criada por um grupo de especialistas em 2003 e revisada em 2004, é um outro exemplo de instrumento cujos parâmetros são utilizados como critério para o preparo do leito e definição de outras intervenções para as feridas de qualquer etiologia na prática clínica. A letra T (*Tissue*) corresponde ao tipo de tecido presente no leito da lesão; a letra I (*Infection*) corresponde à presença de infecção ou processo inflamatório local; M (*Moisture*) está relacionada à quantidade de exsudação e a letra E (*Edge*) está relacionada às características das bordas (CARDINELLI *et al*, 2021; COUTINHO JÚNIOR *et al*, 2020).

A escala de PUSH (*Pressure Ulcer Scale for Healing*) foi desenvolvida para a avaliação de lesões por pressão por especialistas da *National Pressure Ulcer Advisory Panel* em 1996. Em 2005 foi validada para o português, sendo comumente utilizada para avaliação das lesões por pressão e outras etiologias de feridas agudas e crônicas. Seus parâmetros de avaliação são o tamanho e a profundidade da ferida, tipo de tecido presente no leito da lesão e quantidade de exsudato (CARDINELLI *et al*, 2021; GARBUIO *et al*, 2018).

A tríade criada em 2015 (*Triangle of Wound Assessment*) considera as características do leito, das bordas e da região adjacente como parâmetros para avaliação do processo cicatricial de lesões de pele (*cf.* Figura 5). Outros instrumentos estão disponíveis na literatura para classificação, avaliação do risco e/ou cicatrização de feridas, como por exemplo a escala de *Bates-Jansen Wound Assessment Tool* (BWAT), *The Wound Healing Self Score*, MESURE, entre outros (CARDINELLI *et al*, 2021).

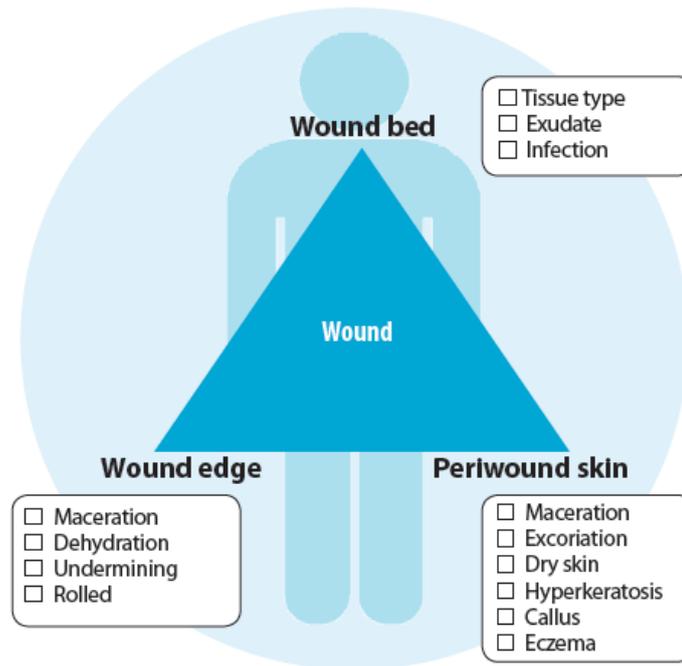


Figura 5 – Tríade de avaliação de feridas.
Fonte: DOWSETT *et al*, 2015.

Recursos visuais, como a imagem 2D obtida por meio da fotografia digital, podem ser utilizados como parte do processo de avaliação de lesões de pele por serem considerados recursos com baixa variação interobservadores. Existem outras formas de avaliação objetiva das feridas, como a mensuração do comprimento e largura por meio de régua ou paquímetro, rastreamento com auxílio de acetato transparente milimetrado e uso de softwares de análise de imagem (ALVES *et al*, 2022).

Após o processo de avaliação das lesões, outras etapas são importantes para o tratamento, como a técnica empregada para limpeza das feridas para a remoção dos corpos estranhos e tecidos desvitalizados, assim como a escolha da cobertura baseada no conhecimento técnico-científico do enfermeiro sobre as diferentes etiologias de lesões de pele e características da lesão, visando um ambiente adequado para o processo de reparação tecidual e adesão ao tratamento, uma vez que favorecem o controle da umidade local e isolamento térmico, promovem conforto, controlam o odor, protegem contra novos traumas e penetração de microrganismos patógenos (GAMBA; PETRI; COSTA, 2016).

São consideradas coberturas para tratamento de feridas, os produtos que proporcionam um meio favorável para o processo de cicatrização, que são de fácil aplicação e manejo, além de formar uma barreira física entre o leito da lesão e o ambiente externo. As coberturas

passivas são aquelas que cobrem e protegem as feridas. As interativas são responsáveis por manter o ambiente favorável ao processo de reparação, mantendo o leito da lesão úmido e as coberturas bioativas estimulam direta ou indiretamente a replicação celular e a síntese de colágeno (BORGES *et al*, 2010; GAMBÁ; PETRI; COSTA, 2016; GEOVANINI, 2014).

As coberturas podem ser classificadas ainda como primárias, quando estão em contato direto com o leito da lesão; as coberturas secundárias são colocadas logo após a cobertura primária, quando necessário. Independente da classificação adotada, cabe ressaltar que a escolha da cobertura e sua utilização estão diretamente ligadas ao conhecimento profissional, facilidade ou dificuldade de aplicação, frequência das trocas, disponibilidade do produto e custo-benefício do tratamento (BORGES *et al*, 2010; GAMBÁ; PETRI; COSTA, 2016).

A seguir será descrito o uso da própolis, com ênfase na própolis verde, como opção de tratamento (cobertura primária) para as lesões de pele.

4.5 PRÓPOLIS

A própolis é uma substância de aspecto resinoso, formada por pólen de diversas flores, exsudato de árvores, plantas e folhas, além das secreções salivares das abelhas de variadas espécies (a mais comum é a *Apis mellifera*), que captam todo este material na natureza. Essa resina presente nas colmeias tem a finalidade de manter a temperatura em 35°C, proteger o local contra a entrada de outros insetos, ocluir aberturas, além de evitar que estados de putrefação ocorram caso estes insetos morram lá dentro (BATISTA *et al*, 2015; SALATINO *et al*, 2005; ANJUM *et al*, 2019; ROJCZYK *et al*, 2020; LAVINAS *et al*, 2019).

Há relatos de uso da própolis pelos egípcios para embalsamar os reis em 300 a.C. Os romanos utilizavam a resina durante as guerras, para tratamento dos ferimentos ocorridos nas batalhas. Os gregos também utilizavam a própolis em perfumes, para o tratamento de feridas e abscessos. Em 1880, na Guerra dos Bôeres, a própolis foi associada a vaselina para o tratamento de lesões. Foi utilizada também na Segunda Guerra Mundial para tratar os ferimentos dos soldados e casos de tuberculose (SALATINO *et al*, 2005; ROJCZYK *et al*, 2020; ANJUM *et al*, 2019).

A coloração da própolis varia de amarelo, marrom escuro a marrom avermelhado e verde, dependendo de sua procedência. Possui odor característico que pode apresentar alteração de uma amostra para outra, devido ao material utilizado que varia de processos botânicos em partes diferentes das plantas, iluminação, espécie das abelhas, entre outros. Na

América do Norte, Europa e oeste asiático, o exsudato do botão de álamo (*Populus sp.*) e a principal fonte da própolis. Na América do Sul é difícil correlacionar a própolis com a fonte produtora, devido à diversidade vegetal encontrada. Na Venezuela e Cuba se produz tipicamente a própolis vermelha, cuja origem botânica vem das espécies de *Clusia nemorosa* e *Clusia scrobiculata* (LUSTOSA *et al*, 2008; ROJCZYK *et al*, 2020).

Independente da sua região de origem, a própolis é basicamente composta de 30% de cera de abelha, 5% de pólen, 10% de óleos essenciais, 50% de bálsamos vegetais e 5% de outros compostos orgânicos. Desta forma, observa-se a complexidade da composição dessa resina, que contém polifenóis, como ácidos fenólicos, flavonoides e ésteres; aldeídos, aminoácidos, ácidos graxos, ésteres, cetonas, minerais, proteínas, entre outros, como evidencia o Quadro 1 (ANJUM *et al*, 2019; BARBOSA *et al*, 2009; OLIVEIRA *et al*, 2012; BATISTA *et al*, 2012).

Quadro 1 – Componentes presentes na própolis.

Componentes	Descrição
<i>Flavonoids, flavanones, flavones and flavonols</i>	<i>Islapinin, Ermanin, Pectolinarigenin, Sakuranetin, Isosakuranetin, Quercetin-3,3'-dimethyl ether, 3-acetyl pinobanksin, Betuletol, Isorhamnetin, Kaempferide, Rhamnazin, Rhamnetin, Alnusin, Alpinetin, Alnusitol, Pinostrobin, Pinocembrin, Chrysin, Tectochrysin, Acacetin, Rhamnocitrin, Quercetin, Galangin, Apigenin, Pinobanksin, Kaempferol, Rutin, Catechin, Luteolin, Naringenin</i>
<i>Benzoic acid and derivatives</i>	<i>Benzoic acid, Salicylic acid, Gentisic acid, Gallic acid, Phenylmethyl ester of benzoic acid, Phenylmethyl ester of salicylic acid, Trans-coniferyl benzoate, Trans-p-coumaryl benzoate, Protocatechuic acid</i>
<i>Benzaldehyde derivatives</i>	<i>Vanillin, Caproic aldehydes, Isovanillin p-hydroxybenzaldehyde, Protocatechualdehyde</i>
<i>Cinnamyl alcohol, cinnamic acid and its derivatives</i>	<i>Cinnamyl alcohol, Hydrocaeffic acid, Isoferulic acid, Cinnamic acid methyl ester, Cinnamic acid ethyl ester, Cinnamylidene acetic acid, Cinnamic acid, Caffeic acid, Ferulic acid</i>
<i>Aliphatic hydrocarbons</i>	<i>Eicosine, 1-octadecene, Tricosane, Pentacosane, Eicosane, Heneicosane</i>
<i>Sugar</i>	<i>d-ribofuranose, d-fructose, d-glucitol, d-gulose, Talose, Sucrose, d-glucose</i>
<i>Vitamins</i>	<i>B1, B2(complex), B6, C, E</i>
<i>Nicotinic acid and Pantothenic acid</i>	

(continua)

Componentes	Descrição
<i>Chalcones and dihydrochalcones</i>	<i>Alpinetin chalcone, Naringinen chalcone, Pinobanksin chalcones, Pinobanksin-3-acetate chalcone, Pinostrobin chalcone, Pinocebrin chalcones, Sakuranetin chalcone, 2'6'a-trihydroxy-4'-methoxy chalcone, 2'6'dihydroxy-40-methoxydihydro chalcone, 2'4'6-trihydroxydihydro chalcone</i>
<i>Amino acids</i>	<i>Alanine, β-alanine, α-amino butyric acid, δ-amino butyric acid, Arginine, Asparagine, Aspartic acid, Cystine, Cystein, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Hydroxyproline, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Ornithine, Phenylalanine, Proline, Pyroglutamic acid, Sarcosine, Serine, Threonine, Tryptophane, Tyrosine, Valine</i>
<i>Esters</i>	<i>Methyl palmitate, Cinnamyl-trans-4- coumarate, Ethyl palmitate, Stearic acid methyl ester, Phthalate ester, Benzyl benzoate, Benzyl-trans-4-coumarate, 3-Methyl-3-butenyl isoferulate, 3-Methyl-2-butenyl isoferulate, 3-Methyl-3-butenyl caffeate, 2-Methyl-2-butenyl caffeate, 3-Methyl-2-butenyl caffeate, Benzyl caffeate, Phenylethyl caffeate, Cinnamyl caffeate, Tetradecyl caffeate, Tetradecenyl caffeate, Tetradecenyl caffeate (isomer), Tetradecanyl caffeate, Hexadecyl caffeate</i>
<i>Other acids and derivatives</i>	<i>Phenylmethyl ester of 14-methylpentadecanoic acid, Ethyl ester of palmitic acid, Myristic acid, Sorbic acid, Butyl-2-methylpropyle ester of Phthalic acid, Stearic acid, Methyl ester of alnustic acid</i>
<i>Alcohol, ketones, phenols and heteroaromatic compounds</i>	<i>Benzyl alcohol, Hexadecanol acetate, Coumarine, Pterostilbene, Xanthorrhoeol, Scopoletol</i>
<i>Terpene, Sesquiterpene, alcohol and derivatives</i>	<i>Geraniol, Neroleol, β-bisabolol, Guaiol, Farnisol, Dihydroeudesmol, α-acetoxylbetulenol</i>
<i>Sesquiterpene and Triterpene hydrocarbons</i>	<i>β -patchoulene, β -bisabolene, Squalene, β-bourbonene, Copaene, Calarene, Calamenene, Caryophyllene, Patchoulane, Selenene, Aromadendrene</i>
<i>Sterols and steroid hydrocarbons</i>	<i>Cholestrilene, Cholinasterol, Stigmasterol, β-dihydrofucosterol, Lanosterol, Cholesterol</i>
<i>Minerals</i>	<i>Sr, Ba, Cd, Sn, Pb, Ti, Ag, Co, Mo, Al, Si, V, Ni, Mn, Cr, Na, Mg, Cu, Ca, Zn, Fe, K</i>
<i>Enzymes</i>	<i>Glucose-6-phosphatase, Acid phosphatase, Adenosine triphosphatase, Succinic dehydrogenase</i>
<i>Ketones</i>	<i>Acetophenone, p-acetophenolacetophenone, Dihydroxy-acetope9i9inone, Methylacetophenone, Hept-5-en-2-one, 6-methylketone</i>

(continua)

Componentes	Descrição
<i>Waxy acids</i>	<i>Archid acid, Behenic acid, Cerotic acid, Lauric acid, Linoleic acid, Lignoceric acid, Montanic acid</i>
<i>Aliphatic acids and aliphatic esters</i>	<i>Acetic acid, Angelic acid, Butyric acid, Crotonic acid, Fumaric acid, Isobutyric acid, Methylbutyric acid, Isobutyl acetate, Isopentyl acetate, Isopentynyl acetate</i>
<i>Alcohol</i>	<i>Benzene methanol, Cinnamyl alcohol, Glycerol, α-glycerophosphate, Phenethyl alcohol, Isobutenol, Hydroquinone, Prenyl alcohol</i>
<i>Aliphatic acids</i>	<i>Lactic acid, Hydroxyacetic acid, Malic acid, 5-Hydroxy-n-valeric acid, 2,3-Dihydroxypropanoic acid, Pentonic acid- 2-deoxy-3,5-dihydroxy-γ-lactone, Pentonic acid- 2-deoxy-3,5- dihydroxy-γ-lactone (isomer), Succinic acid, 2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid- 1,4-lactone, 2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid- 1,4-lactone (isomer), Nonanoic acid, Palmitic acid, Oleic acid, Decanoic acid, Dodecanoic acid, Tetradecanoic acid, Heptadecanoic acid, Octadecenoic acid, Tetracosanoic acid, Eicosanoic acid, Hexacosanoic acid, 2- Hydroxy hexacosanoic acid</i>
<i>Fatty acids (C7-C18 acids)</i>	
<i>Other compounds</i>	<i>Phosphoric acid, 1,4-Dihydroxy benzene, 4-Hydroxy-benzaldehyde, 4-Hydroxy acetophenone, 1,2,4-trihydroxy butane, 1,2,3-trihydroxy butanal, 1,2,3-trihydroxy butanal (isomer), Myristicin, 2,4-bis(dimethyl benzyl)-6-t-butyl phenol, 1,8-dihydroxy-3-methyl anthraquinone, Myristicin (isomer)</i>

Fonte: ANJUM *et al*, 2019.

A própolis verde tem sua origem botânica formada principalmente pelo alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC, da família *Asteraceae*), também conhecido como “vassourinha”, podendo ser encontrada na Argentina, Uruguai e diversas regiões do Brasil. É composta de artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), além dos derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, diterpenos, triptenos e flavonoides (TAVARES *et al*, 2010; BATISTA *et al*, 2012; VEIGA *et al*, 2017; CHEN *et al*, 2019; FILHO *et al*, 2021).

Os compostos fenólicos (ácido cumárico, caféico, ferúlico etc.) e flavonoides (quercetina, crisina, galangina, pinocembrina, canferide, canferol, isosakuranetina, entre outros) tem função antioxidante, combatem os radicais livres e são os principais responsáveis pela propriedade cicatrizante e anti-inflamatória, entre outras propriedades biológicas da

própolis, variando de acordo com a região geográfica de coleta da amostra da resina e solvente utilizado para confecção do extrato. Os prenilados do ácido *p*-cumárico apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, tendo estas propriedades aumentadas quando estão associados aos outros compostos da resina. A artepilina C também é responsável pela atividade antimicrobiana da própolis verde (SALGUEIRO; CASTRO, 2016; FIGUEIREDO *et al*, 2016; VEIGA *et al*, 2017; FILHO *et al*, 2021).

Pode ser comercializada *in natura*, na forma de extratos (por exemplo o extrato etanoico ou hidroalcoólico), loções, géis, cremes, xampus, pastilhas, pós, pastas entre outros. O estudo de Veiga e colaboradores (2017) demonstrou que o extrato etanoico de própolis verde apresenta maior quantidade de artepilina C, compostos fenólicos e flavonoides, proporcionando maior atividade cicatrizante, antioxidante e antimicrobiana para a resina nesta apresentação. Os autores destacam a importância da realização de pesquisas futuras que avaliem a farmacocinética, segurança e toxicidade dos extratos de própolis.

A atividade cicatrizante da própolis está associada à presença das vitaminas, como a vitamina C e E, dos ácidos graxos e dos flavonoides, uma vez que apresentam atividade antioxidante, analgésica, anti-inflamatória e imunomoduladora que favorece a fagocitose e estimula a imunidade celular. Como dito anteriormente, há muitos anos a própolis é utilizada pelas suas propriedades biológicas, incluindo a capacidade de promover a cicatrização de lesões, sem relatos descritos de efeitos colaterais indesejados com a sua aplicação tópica (BARBOSA *et al*, 2009; BATISTA *et al*, 2012; OLIVEIRA *et al*, 2012; ABU-SEIDA, 2015; SOUZA *et al*, 2018).

A presença do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) associado aos outros compostos presentes na própolis confere a atividade antioxidante e anti-inflamatória, inibindo a transcrição e síntese da Interleucina 2 (IL-2) pelas células T ativadas. A sinergia dos compostos presentes na própolis proporciona também atividade antibacteriana, uma vez que inibe a divisão celular destes microrganismos e provoca a bacteriólise. A presença do 3-metil-but-2-eno, do ácido ferúlico e ácido morônico promovem a atividade antiviral (ABU-SEIDA, 2015).

Alguns estudos demonstraram a atividade antimicrobiana da própolis verde contra os vírus, fungos e bactérias, também relacionada à presença dos ácidos fenólicos e flavonoides que favorecem a síntese de prostaglandinas e fagocitose (LIMA, 2018). Barud e colaboradores (2013) avaliaram a atividade da própolis verde contra microrganismos como o

Staphylococcus epidermidis, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* (MSRA), com resultados satisfatórios nos testes *in vitro* para inibição destes microrganismos. Souza e colaboradores (2019) observaram a redução de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* com o uso da própolis verde em biofilmes formados em próteses dentárias. No trabalho de Lima e colaboradores (2018), a própolis verde mostrou atividade antifúngica sobre as cepas de *Candida albicans*, por meio do aumento da mieloperoxidase dos neutrófilos e as espécies reativas de oxigênio.

Diante da descrição das propriedades significativas da própolis verde, realizou-se a busca de artigos científicos que utilizaram esta resina para a cicatrização de lesões, com o objetivo de levantar dados atualizados que possam embasar cientificamente a discussão deste estudo e as futuras pesquisas que abordem essa temática.

4.6 REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA

Com a finalidade de se conhecer as publicações relacionadas ao uso da própolis verde para cicatrização de lesões de pele nos últimos anos, realizou-se uma revisão sistemática cuja coleta de dados se deu em novembro de 2019 a março de 2020. Não houve restrição quanto ao ano de publicação dos artigos, para que a busca abrangesse o maior número de estudos possíveis.

Para o desenvolvimento desta revisão sistemática foram adotados os critérios estabelecidos pelo *Preferred Report Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis* (PRISMA), publicados por Moher e colaboradores (2009). O protocolo de pesquisa foi registrado no *International Prospective Register of Systematic Reviews*, com o número CRD42020187904 (PROSPERO, 2020).

A busca eletrônica por produções científicas nacionais e internacionais se deu nas seguintes bases de dados: Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE/PubMed), *The Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature* (CINAHL) e *Web of Science* via portal CAPES. Entre os artigos selecionados, realizou-se a busca manual em suas listas de referências, a fim de encontrar algum estudo adicional que pudesse ter sido perdido na etapa de busca eletrônica. A literatura cinzenta foi consultada por meio do *Google Scholar* e *Opengrey*.

Utilizou-se a estratégia PICO para nortear esta revisão: Paciente / população / problema de interesse (P) – ratos; Intervenção / área de interesse: uso da própolis verde; Comparação (C) – não se aplica; e *Outcomes* / desfecho (O) – eficácia na cicatrização de feridas cirúrgicas. O presente estudo foi conduzido a partir da questão norteadora: A própolis verde é eficaz na cicatrização de feridas cirúrgicas em animais?

Os seguintes descritores foram utilizados na estratégia de busca dos estudos no Pubmed / Medline, retirados do Medical *Subject Headings* (MeSH): (“propolis” OR “green propolis”) AND (“wound healing” OR “wound” OR “skin injuries” OR “surgical wound”). Para a busca dos artigos na LILACS foram acrescentados aos descritores MeSH os seguintes descritores DeCS: (“propolis” OR “green propolis” OR “própolis”) AND (“wound healing” OR “wound” OR “cicatrização”) AND “skin injuries” OR “surgical wound” OR “ferimentos e lesões”).

Os critérios de inclusão estabelecidos para seleção dos artigos foram: estudos experimentais originais, disponíveis na íntegra, escritos na língua portuguesa, inglesa ou espanhola e que abrangessem a temática do estudo. Não houve restrições quanto ao ano de publicação dos artigos, para que a busca abrangesse o maior número de estudos possíveis.

Foram excluídos os artigos que não atenderam aos critérios de inclusão e os duplicados nas bases de dados, verificados com auxílio da ferramenta *Mendeley*. Também foram excluídos os relatórios ou séries de casos, cartas ou textos de opinião pessoal, revisões integrativas ou sistemáticas, capítulos de livros e resumos de trabalhos apresentados em congressos, assim como estudos que não especificaram o tipo de própolis utilizada ou associaram a própolis verde a outros compostos (ex.: matriz de colágeno), além daqueles que utilizaram a própolis para tratamento de outros tipos de lesões (lesões oculares ou de mucosa oral).

Na primeira etapa foi utilizada a ferramenta Covidence© para facilitar a extração dos dados pela equipe de pesquisadores. Dois revisores examinaram os títulos e resumos, de forma independente, dos artigos previamente selecionados que pareciam cumprir os critérios de inclusão estabelecidos para este estudo.

Na coleta de dados foram identificados 325 artigos e, após a retirada dos duplicados, permaneceram 301 artigos para seguimento da coleta dos dados. Da literatura cinzenta foram

encontrados 568 estudos, mas 10 foram excluídos por serem duplicados, restando um total de 558 artigos, adicionados aos outros 301 das bases de dados para análise do título e resumo.

Após a revisão exaustiva dos títulos e resumos dos artigos por dois revisores, apenas 10 artigos foram selecionados para a segunda etapa, sendo dois deles oriundos da literatura cinzenta (*google scholar*). A busca manual de artigos através das listas de referências dos que foram selecionados não proporcionou nenhum estudo adicional para análise.

Na segunda etapa, os mesmos investigadores leram os textos selecionados na íntegra, também de maneira independente, excluindo aqueles que não cumpriam os critérios de inclusão e exclusão da pesquisa. Em ambas as etapas supracitadas, as discordâncias foram discutidas e resolvidas entre os dois revisores entrando-se em um consenso, não havendo a necessidade de envolver um terceiro revisor.

Os 10 artigos selecionados na segunda etapa foram analisados na íntegra e, este processo, levou à exclusão de seis artigos. No total, quatro artigos foram selecionados para extração dos dados e a síntese qualitativa (*cf.* figura 6).

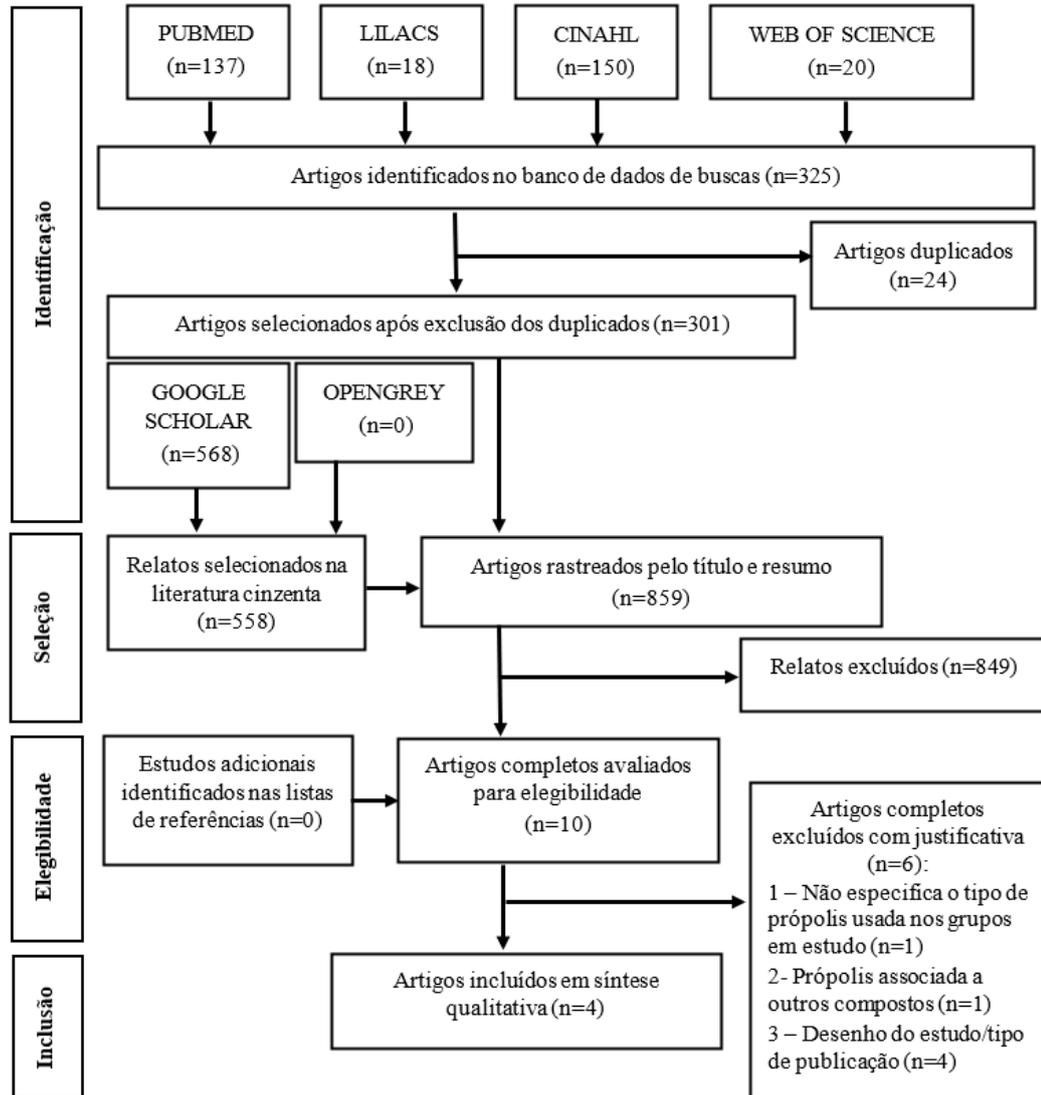


Figura 6 – Fluxograma da busca dos artigos na literatura. Brasília-DF, 2020.

Para avaliação sistemática das publicações selecionadas, foi elaborada uma síntese dos estudos de acordo com o ano de publicação, objetivo, caracterização da amostra, intervenção no grupo experimental, intervenção no grupo controle e principais achados (*cf.* Figura 7).

Autores e ano de publicação	Objetivo	Caracterização da amostra	Intervenção no grupo experimental	Intervenção no grupo controle	Principais achados
Batista LLV et al, 2012	Comparar a ação cicatrizante da própolis verde e vermelha correlacionando ao teor dos flavonoides.	20 ratos machos adultos saudáveis da linhagem <i>Wistar</i> , com peso corporal de 200 + 25 g.	Aplicação de pomada à base de extrato etanólico fluido de própolis verde à 20% em um grupo (n=5) e pomada à base de extrato etanólico fluido de própolis vermelha à 20% em outro grupo (n=5).	Aplicação de pomada base (lanolina + vaselina na proporção de 3:7) no grupo controle positivo (n=5) e solução fisiológica no grupo controle negativo (n=5).	O teor de flavonoides totais do extrato etanólico de própolis verde e vermelha foram elevados; contudo, observou-se que a própolis verde foi mais eficaz no processo de reparação das lesões em ratos.
Barud HS et al, 2013	Demonstrar a atividade antimicrobiana e de cicatrização de feridas da própolis verde.	24 ratos machos adultos saudáveis da linhagem <i>Holtzman</i> , com peso corporal de aproximadamente 250 g. Para análise da atividade antimicrobiana, os microrganismos (<i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>) foram inoculados em placas.	No grupo experimental (n=8) foi aplicado o gel de biocelulose acrescido de extrato etanólico fluido de própolis verde à 2,4%.	No grupo controle positivo (G1) utilizou-se o gel de biocelulose puro (n=8). O grupo controle negativo (G3) não recebeu nenhum tratamento (n=8).	O gel de biocelulose acrescido do extrato etanólico de própolis verde mostrou uma cicatrização de lesão em menor tempo, quando comparado aos outros grupos, bem como maior atividade antimicrobiana. Apesar disso, a avaliação macroscópica dos 3 grupos não mostrou significância estatística ($p > 0,05$).
Mezadri TJ et al, 2009	Avaliar a ação tópica da própolis verde na contração de feridas por meio de suas características macroscópicas e mensuração das lesões utilizando imagens digitais.	10 ratos fêmeas adultas saudáveis da linhagem <i>Wistar</i> , com peso corporal entre 200-250g.	O grupo experimental (lesões 1 e 4) foi tratado com gel de carboximetilcelulose acrescido de extrato hidroalcolico fluido de própolis à 5%.	O grupo controle (lesões 2 e 3) não recebeu nenhum tipo de tratamento.	Os grupos foram acompanhados por 10 dias e, ao final do experimento, todos apresentaram cicatrização total das lesões (não foram observadas diferenças macroscópicas). A metodologia utilizada não se mostrou um bom indicador para avaliar o processo de reparação tecidual neste caso.
Staaq Junior MC et al, 2011	Avaliar a ação tópica da própolis verde na cicatrização de feridas pela contagem de células inflamatórias com auxílio de microscopia óptica.	10 ratos fêmeas adultas saudáveis da linhagem <i>Wistar</i> , com peso corporal entre 200-250g.	O grupo experimental (n=5) foi tratado com gel de carboximetilcelulose acrescido de extrato hidroalcolico fluido de própolis verde à 5%.	O grupo controle (n=5) não recebeu nenhum tipo de tratamento.	Após 24h, o grupo experimental mostrou um número maior de macrófagos, leucócitos e fibroblastos, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Os resultados evidenciaram aumento das células presentes nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização, indicando a ação satisfatória do produto no processo de reparação tecidual.

Figura 7 – Caracterização dos artigos com a aplicação de própolis verde na cicatrização de lesões de pele como objeto de estudo. Brasília, DF, Brasil, 2020.

Para avaliação do risco de viés dos estudos selecionados para síntese qualitativa foi utilizada a ferramenta SYRCLE (*Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation*). A SYRCLE é uma versão adaptada da ferramenta *Cochrane Collaboration Risk of Bias Tool*, frequentemente utilizada para avaliação de ensaios clínicos randomizados. Esta ferramenta foi validada para avaliação de estudos experimentais envolvendo animais em 2014, incluindo os seguintes parâmetros: registro de protocolo de pesquisa, cegamento dos pesquisadores, descrição das características dos animais, avaliação de alocação dos grupos (experimental e controle), adequação da alocação dos animais e distribuição/armazenamento das gaiolas, randomização dos animais para avaliação dos resultados, inclusão de todos os animais na avaliação de resultado do experimento, resultados primários e secundários, além de identificação de outras questões que podem indicar alto risco de viés (HOOIJMANS *et al*, 2014).

O julgamento dos itens propostos pela ferramenta SYRCLE se deu por meio das respostas: “sim” para indicar o baixo risco de viés; “não” para indicar um risco alto de viés e “pouco claro” para indicar que o tópico avaliado apresenta dados insuficientes para a

avaliação do risco de viés. A avaliação dos itens foi realizada por dois revisores e, novamente, não houve necessidade de envolver um terceiro revisor nesta etapa, como mostram os quadros 2 e 3.

Quadro 2 – Avaliação dos critérios de qualidade metodológica feitas pelo revisor 1, baseada na ferramenta SYRCLE. Brasília, DF, Brasil. 2020.

Tópicos	Autores	Batista LLV et al, 2012	Barud HS et al, 2013	Mezadri TJ et al, 2009	Staak Junior MC et al, 2011
1- A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?		Pouco claro	Não	Não	Não
2- Os grupos eram semelhantes no início ou foram ajustados baseados nas variáveis de confusão na análise?		Sim	Sim	Sim	Sim
3- A alocação dos animais para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante sua realização?		Pouco claro	Não	Não	Não
4- Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?		Pouco claro	Não	Não	Não
5- Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados em relação à intervenção que cada animal recebeu durante o experimento?		Não	Não	Pouco claro	Não
6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação do resultado?		Não	Não	Não	Não
7- O avaliador dos resultados foi cegado?		Não	Sim	Não	Não
8- Dados sobre resultados incompletos foram adequadamente trabalhados?		Pouco claro	Pouco claro	Sim	Sim
9- O estudo está livre de registro de resultados seletivos?		Sim	Sim	Sim	Sim
10- O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés?		Pouco claro	Pouco claro	Pouco claro	Pouco claro

Quadro 3 – Avaliação dos critérios de qualidade metodológica feitas pelo revisor 2, baseada na ferramenta SYRCLE. Brasília, DF, Brasil. 2020.

Tópicos	Autores	Batista LLV et al, 2012	Barud HS et al, 2013	Mezadri TJ et al, 2009	Staak Junior MC et al, 2011
1- A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?		Sim	Não	Não	Não
2- Os grupos eram semelhantes no início ou foram ajustados baseados nas variáveis de confusão na análise?		Sim	Sim	Sim	Sim
3- A alocação dos animais para os diferentes grupos foi adequadamente ocultada durante sua realização?		Pouco claro	Não	Pouco claro	Não
4- Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?		Pouco claro	Não	Pouco claro	Não
5- Os cuidadores e/ou investigadores foram cegados em relação à intervenção que cada animal recebeu durante o experimento?		Não	Não	Pouco claro	Não
6- Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação do resultado?		Não	Pouco claro	Não	Pouco claro
7- O avaliador dos resultados foi cegado?		Não	Sim	Não	Não
8- Dados sobre resultados incompletos foram adequadamente trabalhados?		Pouco claro	Pouco claro	Sim	Sim
9- O estudo está livre de registro de resultados seletivos?		Sim	Sim	Sim	Sim
10- O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés?		Pouco claro	Pouco claro	Pouco claro	Pouco claro

Para a análise estatística, o coeficiente de Kappa foi aplicado para avaliar a concordância interobservadores nos itens 1, 6, 7, 8, 9 e 10, conforme sugere HOOIJMANS e colaboradores (2014). Foram considerados os valores <0,00 como sem concordância; 0,00 a 0,20 concordância fraca; 0,21 a 0,40 leve; 0,41 a 0,60 moderada; 0,61 a 0,80 boa; 0,81 a 1,00 como ótima, para um intervalo de confiança de 95% (LANDIS; KOCH, 1977). O software estatístico *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 23.0 foi utilizado para o cálculo do referido coeficiente.

O nível de concordância entre os revisores, comparando as variáveis dependentes analisadas nos quadros 2 e 3, foi de 0,861 (IC95% [0,127 - 4,642]; $p \leq 0,000$), mostrando uma concordância interobservadores considerada ótima.

A análise dos artigos selecionados demonstrou que os anos de 2009, 2011, 2012 e 2013 foram aqueles que tiveram os estudos publicados sobre a temática escolhida. Seguindo os critérios de inclusão e exclusão adotados para esta revisão, os anos de 2010 e de 2014 a 2019 não tiveram publicações selecionadas que respondessem à pergunta de pesquisa.

Em relação ao uso da própolis verde, 50% dos pesquisadores ($n=2$) utilizaram o extrato etanólico de própolis nas concentrações de 2,4% e 20%, associado a outros veículos semissólidos como pomada (lipofílico) e gel (hidrofílico). Os outros 50% dos pesquisadores ($n=2$) usaram o extrato hidroalcolico de própolis à 5% associado a um veículo semissólido hidrofílico (gel). Em nenhum dos estudos selecionados nesta revisão foi aplicado o extrato de própolis puro nas lesões.

A análise dos artigos selecionados mostrou que todos eles utilizaram o extrato de própolis em diferentes concentrações nas formulações, associados a pomadas ou géis para veiculação dos compostos ativos presentes na própolis verde, sem acrescentar outros ativos que pudessem interferir no processo de reparação tecidual. Os estudos apresentam divergências em relação à concentração de própolis necessária para promover a cicatrização de lesões de pele, uma vez que houve uma variação de 2,4 a 20%. Apesar disso, observou-se resultados favoráveis ao processo de cicatrização de lesões com o uso da própolis verde nos ratos (BATISTA *et al*, 2012; BARUD *et al*, 2013; STAAK JUNIOR *et al*, 2011).

Como citado anteriormente, em 50% dos estudos ($n=2$) foi utilizado o extrato etanólico fluido de própolis e os outros 50% utilizaram extrato hidroalcolico também fluido. Pela metodologia implementada nestes experimentos, o uso de ambos os tipos de extratos se mostrou eficaz na cicatrização de lesões de pele, contudo não foi possível determinar diferenças significativas no tempo de cicatrização quando comparadas as duas formulações de extrato de própolis verde (BATISTA *et al*, 2012; BARUD *et al*, 2013; MEZADRI *et al*, 2009; STAAK JUNIOR *et al*, 2011).

É importante salientar que a presença do álcool no extrato de própolis verde não pareceu interferir de maneira negativa no processo de cicatrização das feridas cirúrgicas, uma

vez que foi utilizado como estabilizante da resina na formulação e estava associado a veículos semissólidos que apresentavam água em sua composição.

Apenas dois dos estudos selecionados especificaram a quantidade de produto aplicado nas lesões. No estudo de Batista e colaboradores (2012) foi utilizado 1 mL da pomada contendo o extrato etanólico de própolis nas lesões. Já no estudo de Staak Júnior e colaboradores (2011) foram utilizadas 34 mg do gel que continha o extrato hidroalcolico de própolis verde nas lesões provocadas cirurgicamente nos animais. Na análise dos estudos que compuseram esta revisão sistemática, este fator não pareceu influenciar no processo cicatricial das lesões nos animais, uma vez que foram apresentados dados que demonstraram a cicatrização das feridas em todos os artigos.

O tempo de cicatrização relatado nos artigos variou de 3 a 15 dias (tempo médio de 10,75 dias), sendo a avaliação feita de duas formas: análise microscópica por meio de confecção de lâmina histológica e coleta de amostra sanguínea dos animais para análise bioquímica (colesterol total, triglicérides, albumina, transaminase glutâmica e glicose); análise macroscópica da contração das lesões feita por meio de observação de características teciduais e de sinais de inflamação, registro fotográfico e mensuração das lesões com auxílio de régua e uso de software de imagens específico (BATISTA *et al*, 2012; BARUD *et al*, 2013; STAAK JUNIOR *et al*, 2011; MEZADRI *et al*, 2009). Tais parâmetros possibilitam a avaliação objetiva da lesão, além do acompanhamento do processo cicatricial pelo examinador.

O processo cicatricial de lesões de pele (agudas ou crônicas) é complexo e envolve as células que compõem o sistema imunológico, eventos bioquímicos e inflamatórios, sendo igualmente importante o metabolismo intra e extracelular, entre outros fatores. Os artigos analisados nesta revisão mostraram resultados semelhantes em relação à proliferação de fibroblastos, bem como produção e deposição de colágeno, que são fatores relevantes para o processo de reparação tecidual (BATISTA *et al*, 2012; CORREA *et al*, 2017; JACOB *et al*, 2015).

A atividade antimicrobiana da própolis foi demonstrada no estudo de Barud e colaboradores (2013), corroborando os dados da literatura (MAGALHÃES; LOT; DEL CARRATORE, 2016; BATISTA *et al*, 2012). Nesse estudo, avaliou-se a atividade da própolis verde *in vitro* contra microrganismos como o *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (MSRA) e *Staphylococcus epidermidis*. Após o período de incubação dos microrganismos

citados, foram aplicados discos de 5,5 mm embebidos com a própolis e o diâmetro das zonas de inibição foi mensurado. Os resultados apresentados foram considerados satisfatórios contra todos os microrganismos testados, sugerindo que a própolis verde pode ser utilizada também no tratamento de lesões infectadas.

É importante salientar que a ação antimicrobiana dos produtos para tratamento de feridas é um fator essencial neste processo, uma vez que nas lesões infectadas ocorre o prolongamento da fase inflamatória que influencia diretamente na deposição de colágeno, interferindo na contração e epitelização local, gerando um atraso no processo cicatricial (SILVA *et al.*, 2018).

Os resultados dos estudos selecionados sugerem que o uso tópico dos produtos formulados à base de extrato hidroalcolólico e do extrato etanólico de própolis verde, nas concentrações de 2,4 a 20%, pode promover a cicatrização de lesões de pele, uma vez que favorece a angiogênese, a proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente a síntese e deposição de colágeno. Demonstraram ainda atividade antimicrobiana e não apresentaram toxicidade tissular, fatores estes que são considerados importantes para o processo de reparação tecidual.

Os estudos experimentais recomendam como padrão-ouro o estabelecimento de grupos controle positivo e negativo (placebo) para comparação com o tratamento que está sendo estudado. Uma limitação desta revisão se deu pelo fato de que apenas dois dos artigos selecionados utilizaram grupo controle positivo, mas não estabeleceram o uso de tratamento do melhor tratamento disponível para o manejo de feridas cirúrgicas que pudessem ser comparados ao uso tópico da própolis, que é o recomendado para essa metodologia, comprometendo a generalização dos resultados encontrados devido às suas características heterogêneas.

Observamos também o número reduzido de publicações que se referem ao uso da própolis verde para a cicatrização de lesões de pele. Ressalta-se a necessidade da elaboração de pesquisas cuja metodologia envolva a aplicação de um produto tópico contendo própolis verde em uma concentração eficaz para possibilitar a ação antimicrobiana e anti-inflamatória, uma vez que estes fatores são necessários para a redução do tempo de cicatrização de feridas agudas ou crônicas. Ademais, os produtos desenvolvidos à base de própolis verde deverão garantir a estabilidade durante todo o tempo de utilização para manter suas propriedades químicas, que apresentam inúmeros compostos sensíveis à luz, oxidação e temperatura.

Cabe destacar que os estudos selecionados para esta revisão sistemática também foram utilizados para compor o referencial bibliográfico e subsidiar a discussão desta tese, somados a outras literaturas pertinentes sobre o tema estudado.

Método

5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental desenvolvido em quatro etapas complementares que serão descritas a seguir. Para Creswell (2010), a intenção de um projeto experimental é testar o impacto de um tratamento ou intervenção sobre um resultado, controlando os fatores que possam influenciá-lo.

Os modelos experimentais, também conhecidos como estudos pré-clínicos, compreendem estudos com cadáveres, animais, culturas de células e tecidos, vegetais ou minerais, podendo auxiliar os pesquisadores na compreensão de fenômenos naturais, ampliando o conhecimento relacionados a ação de medicamentos, fisiopatologia de doenças, resultados de intervenções cirúrgicas, entre outros. Há que se ressaltar que as técnicas empregadas variam de acordo com o estudo a ser feito e a importância do cuidado humanizado destinado aos animais ao longo da pesquisa, bem como estratégias para proporcionar bem-estar aos mesmos durante a realização dos experimentos (WATANABE; FONSECA; VATTIMO, 2014; MARCONI; LAKATOS, 2021).

Em 2008 foi aprovada a Lei 11.794 no Brasil, para normatizar o uso de animais em pesquisas científicas e, a partir desta lei, foram criados o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e as comissões de ética para o uso de animais (CEUA) nas instituições, para discussões relacionadas à criação e ao uso destes animais nos estudos (GUIMARÃES; FREIRE; MENEZES, 2016).

Como destacam Watanabe e colaboradores (2014), o conhecimento, responsabilidade e padrões éticos são fundamentais para o planejamento de pesquisas que envolvam animais e os enfermeiros que desenvolvem pesquisas experimentais buscam aprimoramento para relacionar mecanismos fisiológicos, patológicos e ação de drogas com a clínica dos pacientes, contribuindo assim para a sistematização da assistência de enfermagem e o cuidado especializado.

5.2 DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

O desenvolvimento do presente estudo experimental foi realizado em etapas, que serão descritas detalhadamente a seguir.

5.2.1 Primeira etapa: testes farmacêuticos

Aquisição de insumos para a pesquisa

Os testes para desenvolvimento do produto em pó à base de extrato de própolis verde foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) do curso de Farmácia da Universidade de Brasília, *campus* Darcy Ribeiro, por se tratar de um local onde são realizados estudos para o desenvolvimento de produtos inovadores e processos em farmacologia, bem como o controle de qualidade de alimentos, medicamentos, cosméticos, entre outros.

Para início dos testes, foi feito contato com os donos da empresa Mel do Sol, localizada em Águas Lindas-GO (BR 070, Km 02 - Fazenda Cachoeira), para agendamento de visita técnica pelas pesquisadoras. Durante a visita, foi possível conhecer as colônias de abelhas presentes no local, além de todo o processo de produção dos insumos comercializados pela empresa, desde a captação da própolis *in natura* até a transformação em extrato de própolis e outros produtos.

Amostras de própolis verde *in natura* e extrato hidroalcolólico de própolis verde (mínimo de 11%, 20% e 50% de extrato produzido a partir da resina seca) foram cedidos pela empresa Mel do Sol. A origem botânica da própolis verde produzida pela Mel do Sol vem de plantas do bioma do cerrado, em especial do Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*). Foram utilizadas as amostras de extrato hidroalcolólico com o mesmo lote (74/17) para este estudo, a fim de manter a homogeneidade da amostra.



Figura 8 – Extrato hidroalcolólico de própolis verde à 11%.
Fonte: <https://meldosol.com.br/>

O polímero EUDRAGIT® L100 (EUL100) foi cedido pela empresa Evonik para produção do produto em pó utilizado neste estudo (lote B111003013). É produzido a partir da polimerização do ácido metacrílico com metilmetacrilato (1:1). Os polímeros acrílicos são utilizados em formulações farmacêuticas sólidas ou para obtenção de partículas e/ou micropartículas, além do controle de biodisponibilidade, liberação controlada do fármaco e melhorar sua dissolução e absorção (SANTOS, 2013; SILVA, 2020).

A resina sintética em pó para estomias (Brava *Ostomy Powder*®) da empresa Coloplast (lote 5201536) foi obtida comercialmente. Cabe destacar que o produto da referida empresa foi escolhido por se tratar de produto comercial utilizado para o tratamento de lesões de pele disponível nos serviços de saúde da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), não havendo conflito de interesse por parte das pesquisadoras. Trata-se de formulação composta por carboximetilcelulose sódica, goma guar e goma xantina.

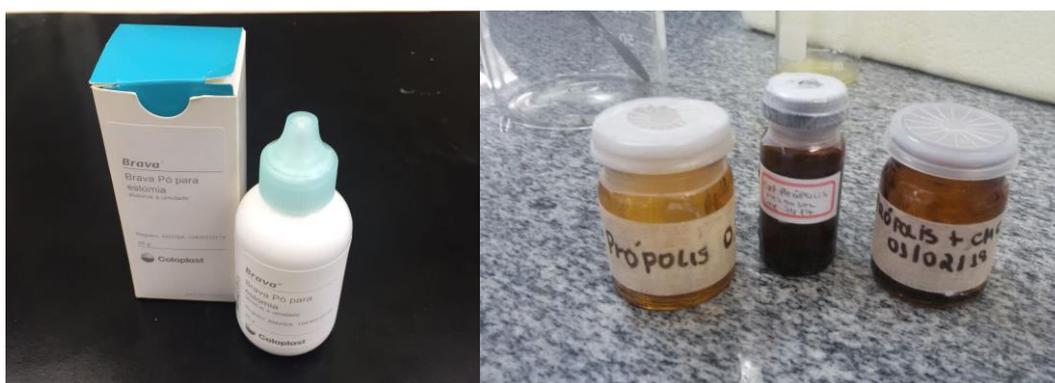


Figura 9 – Insumos utilizados na pesquisa.
Fonte: acervo pessoal das pesquisadoras.

Os demais insumos utilizados para realização dos testes necessários para o andamento da pesquisa, como os solventes, solutos e reagentes (álcool etílico absoluto, álcool metílico, solução fisiológica à 0,9%, carbonato de sódio anidro P.A, sulfato de ferro II heptahidratado P.A, ácido clorídrico puro, ácido tricloroacético P.A, fosfato de sódio monobásico e bibásico P.A, cloreto de alumínio III hexahidratado P.A, quercetina dihidratada, carboximetilcelulose sal sódico P.A, reagente de Folin & Ciocalteu, DDPH, ABTS, ácido tiobarbitúrico P.A, água destilada e água ultrapurificada) e as vidrarias foram cedidos pelo LTMAC.

Não há conflito de interesse com os laboratórios que produziram os insumos utilizados nesta pesquisa.

Testes farmacêuticos

Com o objetivo de avaliar a qualidade da própolis utilizada para este estudo, foi realizada a determinação do teor de sólidos solúveis da própolis verde *in natura* e do extrato hidroalcolóico de própolis comercial. Realizaram-se os testes em triplicata, com alíquotas de 1 mL de ambas as amostras em béqueres de 50 mL, com pesagem prévia e posterior secagem total. O resíduo foi pesado novamente e o teor de sólidos solúveis (TSS) foi calculado a partir da seguinte equação (BRAGA, 2018):

$$TSS (\%) = \frac{M_f}{M_o} \times 100$$

Onde M_o é a massa do extrato antes da secagem e M_f é a massa do resíduo seco.

Para a realização do cálculo do teor de sólidos solúveis da própolis *in natura* foi elaborada uma solução a partir da dissolução de 11 mg própolis *in natura* em 10mL de solução hidroalcolóica 50%, com auxílio de banho ultrassônico por 40 minutos e filtração frontal com membrana hidrofílica.

O cálculo do teor de sólidos solúveis da própolis verde seguiu as recomendações do Ministério da Agricultura (MAPA), que determina a presença de resíduo seco de própolis em um valor mínimo de 35% para controle do crescimento microbiano (BRASIL, 2001). Os cálculos supracitados para as amostras usadas no presente estudo mostraram valores acima de 87%, sendo considerados adequados para uso da resina nesta pesquisa.

Posteriormente foram realizadas análises fitoquímicas qualitativas para identificação de alcaloides, através do ensaio de precipitação e coloração com reagentes gerais (resultado positivo): *Dragendorff* (precipitado alaranjado), *Mayer* (precipitado branco) e *Bouchardat* (precipitado marrom); a análise dos triterpenos e esteroides foi realizada por meio do protocolo de *Lieberman-Buchard*; para análise das saponinas foi realizado o ensaio de afrogenicidade. A determinação de antraquinonas foi realizada pela reação de Bornträger, por visualização da coloração rósea-avermelhada quando presente as diacetonas.

As análises supracitadas mostraram que a presença de alcaloides variou entre as amostras de própolis *in natura* e extrato de própolis à 11%, evidenciando que o local e o método de coleta da própolis podem influenciar na presença ou ausência deste componente. O objetivo destas análises foi constatar a presença de metabólitos secundários que conferem à própolis suas características biológicas como a atividade cicatrizante, anti-inflamatória,

imunomoduladora, entre outras. Não foi observada presença de antraquinonas nas duas amostras avaliadas. Contudo, observou-se a presença de triterpenos e esteroides em ambas as amostras. A ausência de saponinas nas amostras testadas também evidenciou a variância dos componentes da própolis verde a depender da região geográfica em que a resina foi coletada (BRAGA, 2018).

Ensaio preliminares como avaliação do comprimento de onda com maior pico de intensidade de resposta para absorvância do flavonoide quercetina e equação de reta de regressão linear correlacionada à observância e concentração de quercetina (além do tempo de reação de complexação) também foram realizados para cálculo do teor de flavonoides. As amostras de extrato de própolis verde (comercial e o produzido a partir da própolis in natura) foram submetidas à análise por meio do espectrofotômetro UV-Vis à 430nm. O extrato comercial de própolis verde mostrou, em termos de percentagem massa/massa, teor de flavonoides de 0,29%, atendendo o mínimo de 0,25% disposto na legislação (SILVA, 2020).

Para a produção do curativo à base de própolis, micropartículas do extrato hidroalcolico de própolis verde à 11% foram incorporadas a um copolímero acrílico (Eudragit L100), produzidas a partir do equipamento *Spray Dryer* (Labmaq, MSD 1.0), sem contato com o ambiente externo. O bico automatizador de 1,2mm, temperatura de entrada de 135°C, vazão do ar de secagem de 4,5 m³/minuto e vazão da amostra de 0,35 L/h foram as condições de secagem usadas no referido equipamento. A finalização do produto se deu através da mistura manual das micropartículas em morteiro (PRP: EuL100, na proporção de 1:3 p/p) e a carboximetilcelulose (CMC sal sódico lote 200391).

A eficiência de encapsulação dos flavonoides do extrato de própolis com Eudragit L100 por *spray drying* foi de cerca de 90%, corroborando os dados da literatura (SILVA, 2020). A quantificação dos metabólitos ativos do curativo produzido, como os compostos fenólicos e teor de flavonoides foi de, respectivamente, 699,46±8,81 mg EAG/mg e 83,73±0,92 mg EQ/mg, sendo os valores considerados efetivos quando comparados à outros estudos que utilizaram a mesma técnica de produção de micropartículas (SILVA, 2020).

Para análise das características reológicas do produto produzido para este estudo e do produto comercial foi realizada a análise de fluxo de materiais pulverulentos, determinando-se o ângulo de repouso e ângulo de queda, assim como o ângulo de diferença entre ambos; além do ângulo de espátula, densidade compactada, densidade aparente, compressibilidade, coesão e a dispersabilidade. No LTMAC, foi utilizado o analisador de fluxos sólidos (Hosokawa

Micro B.V Holanda) que aplica o método desenvolvido em 1995 para determinar o índice Carr para *flowability* e *floodability* (SILVA, 2020).

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 23.0 para Microsoft Windows®. O índice Alpha (ou Alfa de Cronbrach) foi calculado para avaliação da repetibilidade dos ensaios e, para comparação dos produtos (micropartículas, CMC, produto desenvolvido e o produto comercial), foi realizado a análise de variância (ANOVA) não paramétrica, quando aplicável, considerando-se um nível de significância de 5%.

Os resultados obtidos a partir do índice Alpha demonstraram que as médias não apresentaram diferença significativa do parâmetro avaliado, ou seja, os testes não apresentaram repetibilidade, mesmo se tratando da mesma amostra e mesmos operadores. Isso se deve ao fato de que as formulações em pó (tanto do produto produzido quanto do produto comercial) foram se transformando durante os testes, tornando-se mais coesos e, portanto, não se repetindo, sendo o resultado esperado para esta etapa de análise das formulações.

Em relação ao ângulo de espátula (ANOVA não paramétrica), não houve diferença estatística entre as amostras ($p = 0,154$). Na análise da dispersabilidade, o produto produzido se mostrou diferente do comercial ($p < 0,01$), indicando maior dispersão quando aplicado e, a partir deste resultado, optou-se por aumentar a densidade do produto produzido para aprimoramento da fórmula, evitando a perda do material quando este fosse aplicado nos testes *in vivo* (BRAGA, 2018).

A partir dos testes de dispersabilidade, coesão, ângulo de espátula, ângulo de queda, *flowability* e *floodability*, bem como a avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DDPH, ABTS e TBARS, observou-se que o produto em pó à base de extrato de própolis verde à 11% associado a um copolímero acrílico e CMC apresentou característica antioxidante superior ao extrato de própolis verde em altas temperaturas (135°C), mantendo suas características físico-químicas e possibilitando assim o seu uso na segunda etapa do experimento (*cf.* Figura 10). A concentração equivalente em Trolox (mM) corresponde à maior atividade antioxidante quando apresentar o menor valor calculado (BRAGA, 2018).

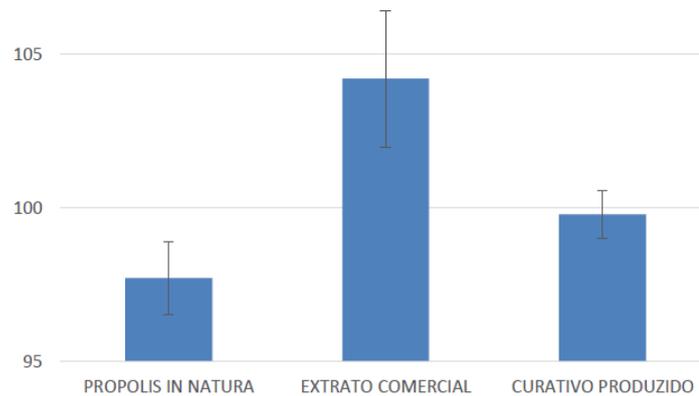


Figura 10 – Características antioxidantes da própolis *in natura*, extrato hidroalcolóico de própolis verde à 11% e curativo produzido com o extrato de própolis verde utilizando a tecnologia de *Spray Dryer* pelo método DDPH. Comparação de concentração equivalente em Trolox (mM).

Fonte: BRAGA, 2018.

Para a formulação elaborada para este estudo foi calculada a concentração inibitória (IC50) por meio dos métodos DDPH, ABTS e TBARS para avaliação da atividade antioxidante da própolis, cujos valores foram respectivamente $531,87 \pm 21,82$ μmol de Trolox/mg, $1178,90 \pm 114,24$ mM de Trolox/mg e $64,09 \pm 8,83\%$, sendo a concentração necessária para inibir 50% da atividade do radical livre. No LTMAC foram realizados outros testes seguindo a legislação vigente e as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso de própolis em formulações farmacêuticas, demonstrando que o extrato hidroalcolóico de própolis verde utilizado para formulação do produto em pó utilizado neste estudo manteve a estabilidade de suas propriedades antioxidantes e o teor dos flavonoides, quando comparado à própolis *in natura* (BRAGA, 2018; SILVA, 2020).

Um ensaio de membrana corioalantoide (HET-CAM) foi realizado com 30 ovos embrionados de galinha (8º dia de incubação), cedidos pela empresa Avifran (Avicultura Francesa localizada em Planaltina-GO). Tal ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a toxicidade do produto criado como substituição ao teste *in vivo* de avaliação de toxicidade e potencial irritativo de formulações farmacêuticas (SILVA, 2020).

A “CAM” é uma membrana formada pela junção do cório e alantoide dos embriões, funcionando como órgão excretor, respiratório e de armazenamento. Com a realização deste ensaio utilizando tal membrana, torna-se possível analisar a segurança biológica dos produtos, como o potencial irritante e inflamatório (citotoxicidade), sendo um método alternativo que

substitui o uso de animais nesta etapa do desenvolvimento farmacêutico, além do seu baixo custo operacional (SILVA *et al*, 2021). Foi observada reação não-irritante severa do produto produzido para esta pesquisa e do produto comercial (Brava *Ostomy Powder*®), a partir do ensaio HET-CAM e, desta forma, seguiu-se para a próxima etapa da pesquisa (teste *in vivo*).

5.2.2 Segunda etapa: Teste *in vivo*

Amostra

Para calcularmos a amostra necessária para realização desta etapa da pesquisa utilizou-se a fórmula $AT = n^{\circ} \text{ de grupos de comparação} \times n^{\circ} \text{ de subgrupos de comparação} \times n^{\circ} \text{ de animais}$, fornecida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília. Para estimar o número de animais por grupo e subgrupo, justificamos os valores baseados no número de animais utilizados em outros experimentos (GARROS *et al*, 2006; COELHO *et al*, 2010; EURIDES *et al*, 2011; ABREU *et al*, 2011), conforme orientação descrita no formulário específico fornecido pela referida comissão da instituição de ensino.

No caso de estudos experimentais com animais, deve ser selecionada amostra com o menor número possível deles. É importante garantir um ambiente controlado, com manutenção dos parâmetros genéticos e sanitários durante toda a execução do experimento (WATANABE; FONSECA; VATTIMO, 2014).

A aquisição dos animais se deu por meio do Biotério de Produção de Ratos da Universidade de São Paulo (USP), que os enviou por transporte aéreo com auxílio da Granja RG, garantindo conforto e segurança durante todo o trajeto de São Paulo-SP a Brasília-DF.

Nesta pesquisa foram utilizados 27 ratos machos adultos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* que, após avaliação criteriosa dos dois veterinários do biotério da Faculdade de Medicina da UnB, atestou-se as condições físico-clínicas apropriadas para a realização do estudo. Optou-se pelo uso apenas dos ratos machos para manter a isonomia da amostra e evitar as alterações hormonais que pudessem interferir no resultado da pesquisa.

Os animais permaneceram em alojamento apropriado e foram acondicionados em gaiolas de polipropileno, com dimensões de 35cmx50cmx20cm; tiveram um período de sete dias para ambientação e aclimação no laboratório, com temperatura do local em torno de 22°C e umidade variando entre 50 e 60%, além de fotoperíodo alternando entre 12h no claro e 12h no escuro. Os ratos receberam ração balanceada e água *ad libitum* durante todo o

experimento, conforme preconiza a legislação e a literatura que versa sobre o assunto (MARQUES, 2005; NEVES, 2013).

Coleta de dados

Após a etapa de ambientação no biotério, iniciou-se a coleta de dados da pesquisa e, para tal, todos os animais foram pesados no primeiro dia, observando-se um peso corporal que variou de 270g a 380g. Esta fase da pesquisa teve um período de duração de 11 dias.

Os animais foram sedados com cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (na dose de 100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente) via intraperitoneal após pesagem de todos eles para cálculo da dose. Após a sedação, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em prancha de madeira, com contenção dos membros; realizou-se a tricotomia dos pelos no dorso com auxílio de tricotomizador elétrico em uma área de 16 cm² (4 cm x 4 cm). Em seguida, procedeu-se com a antissepsia local utilizando álcool à 70% e álcool iodado à 2%.

Optou-se pela indução cirúrgica das lesões no dorso dos ratos por ser um modelo amplamente utilizado em estudos experimentais com animais para avaliação dos processos cicatriciais e para evitar que eles atingissem o local e/ou retirassem os produtos em estudo.

As lesões foram provocadas cirurgicamente no próprio dorso utilizando-se um *punch* metálico estéril e descartável de 6 mm de diâmetro e auxílio de lâmina de bisturi n°22 para exposição da fáscia muscular. Por fim, os ratos foram alocados de forma aleatória simples em três grupos pré-definidos, conforme descritos abaixo:

- Grupo I: Controle Negativo com Solução Fisiológica à 0,9% (GCN): 9 animais
 - Subgrupo de avaliação no 7º dia de pós-operatório: 3 ratos
 - Subgrupo de avaliação no 9º dia de pós-operatório: 3 ratos
 - Subgrupo de avaliação no 11º dia de pós-operatório: 3 ratos
- Grupo II: Grupo de Tratamento com Extrato de Própolis à 11% (EP11): 9 ratos
 - Subgrupo de avaliação no 7º dia de pós-operatório: 3 ratos
 - Subgrupo de avaliação no 9º dia de pós-operatório: 3 ratos
 - Subgrupo de avaliação no 11º dia de pós-operatório: 3 ratos

- Grupo III: Controle Positivo com Brava *Ostomy Powder*® (GCP): 9 animais
 - Subgrupo de avaliação no 7º dia de pós-operatório: 3 ratos
 - Subgrupo de avaliação no 9º dia de pós-operatório: 3 ratos
 - Subgrupo de avaliação no 11º dia de pós-operatório: 3 ratos

Todos os ratos receberam analgesia com dipirona, na dosagem de 0,1 mL via subcutânea por 24h após a confecção das feridas, a fim de promover bem-estar e controle da dor. Os ratos foram identificados com numeração de 1 a 27 na calda, com auxílio de caneta permanente, para controle da avaliação macroscópica das lesões e realização dos curativos, uma vez que foram acondicionados 3 animais por gaiola para que socializassem entre si, visando o seu bem-estar durante a realização do estudo, conforme orientação dos veterinários do biotério.

As lesões foram deixadas cicatrizar por segunda intenção, por orientação dos veterinários responsáveis pelo biotério, uma vez que a tentativa de oclusão das lesões com gaze e atadura deixou os animais agitados, o que poderia comprometer o andamento do estudo. O curativo foi realizado a cada 48 horas, seguindo procedimento padrão estabelecido para esta pesquisa: limpeza do leito da lesão com solução fisiológica à 0,9% em temperatura ambiente com auxílio de uma agulha 25x0,8 mm acoplada em uma seringa de 20 mL, proporcionando uma pressão de irrigação entre 4 e 15 psi suficiente para remover detritos e exsudação presentes, além do uso de gazes estéreis (GEOVANINI, 2014).

Os produtos em teste foram utilizados como cobertura primária, em quantidade suficiente para cobrir todo o leito das lesões, conforme os grupos de estudo previamente definidos: produto em pó à base de extrato hidroalcoólico de própolis verde à 11% (EP11), produto comercial Brava *Ostomy Powder*® (GCP) e a solução fisiológica à 0,9% (GCN). As lesões não foram ocluídas com nenhum tipo de cobertura secundária e os animais não foram sedados durante a realização dos curativos.



A – Posicionamento do animal para confecção da ferida. B – Aplicação do produto em pó à base de própolis verde no pós-operatório imediato da confecção da lesão.

Figura 11 – Confecção das lesões nos ratos e aplicação do produto em pó.

Nos 7º, 9º e 11º dias de tratamento, 3 ratos de cada grupo foram selecionados aleatoriamente e, após procedimento de sedação, realizou-se a coleta de fragmento de tecido das lesões cirúrgicas com auxílio de lâmina de bisturi nº 22, cujo parâmetro foi 1 cm de borda íntegra e profundidade que alcançasse a fáscia muscular, para a produção das lâminas histológicas e posterior análise do material.

Análise macroscópica e morfométrica

Durante a coleta de dados, foram realizados registros fotográficos por meio da câmera fotográfica EOS Rebel T6i da Canon® de 24 megapixels posicionada à 20 cm de distância e 90º da lesão.

Para análise macroscópica das lesões, a tríade criada por Dowsett e colaboradores (2015) foi utilizada como parâmetro de avaliação, uma vez que considera as características do leito da ferida, bordas e pele adjacente. Uma escala Likert foi aplicada para avaliação do leito da ferida, exsudação e a presença de crostas (*cf.* quadro 4).

Quadro 4 - Avaliação das características macroscópicas das lesões. Brasília-DF, 2019.

Característica avaliada	Escala de Likert
Tecido de granulação	0 – ausente 1 – presente em 25% do leito 2 – presente em 50% do leito 3 – presente em 75% do leito 4 – presente em 100% do leito

Característica avaliada	Escala de Likert
Tecido desvitalizado (necrose e/ou esfacelo)	0 – ausente 1 – recobre 25% do leito 2 – recobre 50% do leito 3 – recobre 75% do leito 4 – recobre 100% do leito
Crostas	0 – ausente 1 – presente em 25% do leito 2 – presente em 50% do leito 3 – presente em 75% do leito 4 – presente em 100% do leito
Tecido de epitelização	0 – ausente 1 – presente em 25% do leito 2 – presente em 50% do leito 3 – presente em 75% do leito 4 – presente em 100% do leito
Exsudação sanguinolenta	0 – ausente 1 – leve (1+/4+) 2 – moderada (2+/4+) 3 – grande (3+/4+) 4 – intensa (4+/4+)

Para a análise morfométrica, a mensuração periódica do comprimento e largura das lesões foram feitas com auxílio de régua descartável graduada em milímetros e as imagens foram posteriormente avaliadas através do software ImageJ para cálculo das áreas. Os dados obtidos foram registrados em planilha do Microsoft Excel® para posterior análise dos resultados.

A análise estatística desta etapa supracitada também foi feita utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 23.0 para Microsoft Windows®. A normalidade da amostra foi definida pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise dos dados multivariados e qualitativos foi realizada através do teste Qui-quadrado. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para avaliação da associação entre as variáveis comprimento e largura das lesões. A análise de variância ANOVA e o teste de Tukey foram

calculados para comparação entre as variáveis área de lesão e os grupos estudados, além da comparação entre as médias das áreas das feridas. O intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) foram considerados como parâmetros para a análise estatística.

5.2.3 Terceira etapa: coleta de amostra de sangue para análise bioquímica

Ao final do experimento (11º dia), os animais foram novamente sedados e realizou-se a coleta de 2 mL de sangue via intracardíaca para análise bioquímica do material. As amostras de sangue foram separadas em tubos que continham EDTA sódico à 10% para a realização dos parâmetros hematológicos e tubos secos para os parâmetros bioquímicos, com a finalidade de avaliação da função hepática para verificação da toxicidade do produto criado para este estudo e o perfil inflamatório, em comparação com os outros produtos utilizados na pesquisa.

Os parâmetros hematológicos como hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), volume plaquetário médio (VPM), plaquetas, leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos, foram analisados através de contador automatizado Sysmex, modelo Xs1000i (Roche) e as lâminas avaliadas através de microscopia óptica, mediante *flags* apresentadas pelo analisador.

Os parâmetros bioquímicos determinados para esta pesquisa foram: aspartato aminotransferase (AST ou TGO), alanina aminotransferase (ALT ou TGP) e fosfatase alcalina (ALP ou FA), dosados através do analisador automatizado ABBOTT, modelo ARCHITECT C 8000.

Para análise do perfil inflamatório, os níveis das citocinas pró-inflamatórias Interleucina 6 (IL-6) e o da citocina anti-inflamatória Interleucina 10 (IL-10) foram determinados por meio do método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) com os de kits da Invitrogen-BioSource International (Camarillo, CA). A técnica se baseia no método conhecido como “sanduíche”; as amostras de soro armazenadas a -80°C foram previamente descongeladas e colocadas em placas individuais sensibilizadas com anticorpo específico para interleucina IL-6 e IL-10 de rato.

As amostras supracitadas, incluindo os padrões de conteúdos conhecidos de IL-6 e IL-10 e espécimes controle foram pipetados para os diferentes poços, seguidos da adição de um segundo anticorpo monoclonal conjugado. Após esta etapa, realizou-se um período de

incubação por um tempo total de 2 horas. Em seguida, a remoção do excesso de segundo anticorpo foi feita por 4 lavagens sucessivas e a estreptavidina-peroxidase foi adicionada. Esta enzima se liga ao anticorpo conjugado para completar os quatro membros do “sanduíche”.

Uma nova incubação foi realizada por um período de 30 minutos e, em seguida, quatro sucessivas lavagens para remoção de todas as enzimas não ligadas. Uma solução substrato, conhecido como cromógeno, foi adicionada para reagir com a enzima e produzir a cor azul. A intensidade do produto colorido é diretamente proporcional à concentração das citocinas presentes. O teste ELISA foi realizado para duplicatas das amostras e padrões, sendo realizada a média entre as absorbâncias a partir da leitura realizada pela LEITORA DE MICROPLACAS BIOLISA READER - R792 em comprimento de onda de 450nm.

Os parâmetros supracitados foram expressos por meio de valores estatísticos como média e desvio padrão. Os valores apresentados no estudo de Lima e colaboradores (2014), bem como os apresentados no estudo de Dantas e colaboradores (2006), foram utilizados como referência para as análises bioquímicas realizadas para os animais do presente estudo.

O teste estatístico de ANOVA foi aplicado para análise de todos os parâmetros laboratoriais, verificada as pressuposições de normalidade por meio do teste Shapiro-Wilk, com pós-teste de Dunnet para comparação dos valores dos testes bioquímicos e hematológicos, além do perfil inflamatório entre os grupos tratamento e controle positivo com o controle negativo. O nível de significância estatístico adotado foi de 5%. O programa utilizado para confecção dos gráficos foi o GraphPad versão 6.0.

Após o término das coletas de amostra de sangue dos ratos, que ainda estavam sedados, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono e suas carcaças foram acondicionadas em sacos brancos identificados, com posterior descarte em local apropriado após tratamento dos resíduos.

Cabe ressaltar que, após avaliação dos veterinários do biotério em conjunto com as pesquisadoras, optou-se por finalizar o experimento no 11º PO, devido ao tamanho e peso dos animais naquele momento, visando seu bem-estar, conforme preconiza a legislação vigente que versa sobre o uso de animais em pesquisas. Ademais, os animais do grupo tratamento (EP11) apresentavam a maioria das lesões cicatrizadas, o que não prejudicou a análise dos dados quanto optou-se por finalizar o experimento nesse período.

5.2.4 Quarta etapa: análise histológica

Confecção das lâminas histológicas

Os fragmentos de tecido foram armazenados em potes estéreis preenchidos com formalina neutra tamponada e assim permaneceram imersos nesta solução por 24 horas. Em seguida, procedeu-se à desidratação manual do material; os fragmentos foram deixados imersos em álcool à 70% por 24 horas e após este período, permaneceram em álcool à 80% por 1 hora, álcool à 90% por 1 hora e álcool à 96% por 1 hora.

Posteriormente, os fragmentos permaneceram em contato com álcool absoluto por três horas (com renovação do volume do líquido a cada hora) e depois foram colocados em contato com uma mistura de álcool e xilol na proporção de 1:1 por uma hora. Dando seguimento ao processo de preparação das lâminas, as amostras de tecido foram colocadas em contato com xilol puro por três horas (com renovação do volume do líquido a cada hora) para fixação do material.

Procedeu-se com a etapa de processamento histológico, que compreende as fases de desidratação, diafanização e impregnação. A desidratação é realizada com álcool nas concentrações de 80°, 90° e 100°, para retirada total da água dos tecidos. Para manter a arquitetura tecidual, os espaços nos tecidos causados pela desidratação são preenchidos por uma mistura de parafina e polímeros plásticos (Paraplast®) fundidos a temperaturas em torno de 58 e 60°C, cujo processo é conhecido como impregnação. Como a parafina não se mistura com o álcool, o xilol foi utilizado como ponte entre as duas substâncias; neste processo, o tecido se torna mais claro e esta etapa é conhecida como diafanização.

Após os procedimentos supracitados, os fragmentos de tecido coletados dos animais em estudo foram colocados em blocos obedecendo alguns critérios técnicos de posicionamento e ordenação durante o processo, para facilitar a obtenção de um corte de qualidade. Realizou-se a microtomia para os cortes microscópicos, de forma cautelosa para manter a uniformidade das amostras (5µm). As lâminas foram preparadas antes da microtomia para favorecer a fixação do material. Os cortes histológicos foram colocados em estufa (65°C), permitindo que a parafina que circundava o corte escorresse e a amostra permanecesse fixa na lâmina de vidro.

O material foi passado novamente no xilol, álcool absoluto 100°, álcool 95° e álcool 80° e, por fim, água corrente. Em seguida, as amostras foram coradas com hematoxilina e

eosina (HE) e com picrossírius; foram fixadas na lamínula com verniz para que fosse possível a visualização dos tecidos no microscópio óptico com objetivas de 10x e 40x, proporcionando a avaliação da proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno, neovascularização e infiltrado inflamatório, que foi realizada por histologista experiente de maneira cegada. A escala de Likert foi aplicada para todas as variáveis de avaliação supracitadas, considerando os seguintes valores:

Quadro 5 – Descrição dos escores de avaliação qualitativa das lâminas histológicas.

Escores	Descrição	% visualizada na amostra
0	Ausente	-
1	Leve	Até 33%
2	Moderado	De 33 a 67%
3	Intenso	De 67 a 100%

5.3 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

Os princípios éticos foram observados por meio das diretrizes e normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações, que versam sobre ética e outros assuntos pertinentes às pesquisas envolvendo animais (BRASIL, 2016).

O presente estudo foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, responsável pela avaliação do mérito e relevância da realização de projetos de pesquisa experimentais desenvolvidos com animais. O projeto foi aprovado no dia 19 de fevereiro de 2019, pelo parecer nº 80/2018 (ANEXO A). A coleta de dados foi iniciada após o parecer favorável à execução da pesquisa.

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DO PROCESSO CICATRICIAL

Os animais se recuperaram do procedimento anestésico e cirúrgico de maneira satisfatória, após administração da medicação analgésica por 24 horas, sem ocorrência de óbito por complicações inesperadas. Os 27 animais apresentaram sangramento após a confecção das feridas, mas foi observada hemostasia adequada em todos eles no pós-operatório imediato.

As avaliações clínicas mostraram que os animais mantiveram a atividade física, alimentação e estado geral preservados. As feridas cirúrgicas induzidas nos animais foram avaliadas macroscopicamente no 3º PO, 5º PO, 7º PO, 9º PO e 11º PO, conforme o protocolo estabelecido para o estudo.

Em relação ao tecido de granulação, foi possível observar sua presença a partir do terceiro dia de avaliação, em 100% dos animais dos grupos estudados (n=27). Mesmo com as lesões expostas, o tecido viável manteve suas características de coloração vermelho-vivo durante a realização dos curativos.

Sobre a presença de tecido desvitalizado, houve formação de crostas amareladas finas a partir do 3º PO em todos os grupos; em especial, no GCN (n=9) as crostas recobriam todo o tecido de granulação. Foi possível a remoção das crostas por desbridamento mecânico, sem intercorrências durante o procedimento. Não foi observada a presença de edema nos 11 dias de avaliação.

A partir do 7º PO houve formação de necrose nas lesões dos animais dos grupos controle negativo (n=2), tratamento (n=1) e controle positivo (n=1). Procedeu-se com a remoção parcial do tecido desvitalizado antes da aplicação dos produtos em teste. No 9º PO, observou-se a presença de necrose em 25% dos leitos das lesões nos três grupos estudados: GCN (n=2), EP11 (n=1) e GCP (n=1). Já no 11ºPO, havia presença de necrose apenas na lesão de um dos ratos do grupo controle negativo (n=1).

As bordas das lesões permaneceram regulares e aderidas do pós-operatório imediato ao 11º PO, em 100% dos animais dos três grupos (n=27). Não foram observados descolamentos da borda ou sinais de epíbole durante o experimento. A região perilesão

também permaneceu íntegra ao longo dos 11 dias de avaliação. A figura 12 mostra a evolução das lesões por grupo de tratamento do 3° ao 11° PO. Não foram observados sinais de mordedura próximo às lesões durante a realização do experimento.

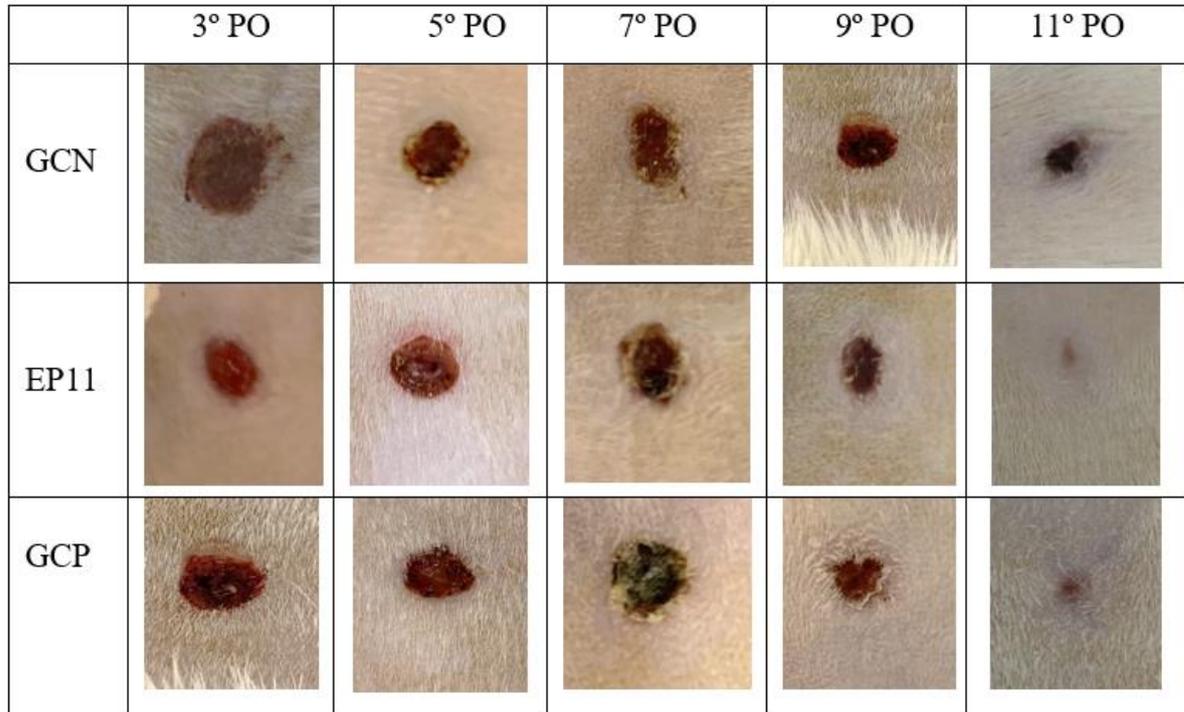


Figura 12 – Aspectos macroscópicos das lesões dos Grupos Controle Negativo (GCN), Tratamento (EP11) e Controle Positivo (GCP).

Em relação à infecção das feridas, 100% das lesões dos animais do Grupo Tratamento (EP11) e do Grupo Controle (GCN e GCP) não apresentaram sinais clínicos de infecção, como exsudação purulenta com ou sem odor, alteração de coloração no tecido de granulação, sangramento, formação de biofilme (visíveis a olho nu) e hiperemia com calor local em região perilesão. Os ratos não apresentaram mudança de comportamento que sugerissem presença de dor durante o experimento.

A comparação entre os grupos EP11 e GCP em relação ao placebo (GCN) mostrou significância estatística para as variáveis estudadas na avaliação macroscópica, como tecido de granulação ($p = 0,023$) e tecido de epitelização ($p = 0,041$). Não foi observada significância estatística na comparação entre os três grupos para as variáveis classificadas como tecido desvitalizado ($p = 0,67$), crostas ($p = 0,061$) e exsudação ($p = 0,343$).

As lesões apresentaram profundidade superficial em relação à região perilesão a partir do 3° PO nos animais dos três grupos de estudo ($n=27$). Observou-se a contração das lesões a

partir do terceiro dia de coleta de dados, em todos os grupos, como mostram os valores detalhados na Tabela 1.

Tabela 1 – Mensuração do comprimento e largura das feridas em centímetros. Brasília-DF, 2019.

Grupos de avaliação	Dia 0	Dia 3	Dia 5	Dia 7	Dia 9	Dia 11
Grupo Controle Negativo	0,6 x 0,6	0,6 x 0,5	0,5 x 0,4	0,3 x 0,3	0,2 x 0,3	0,1 x 0,2
	0,6 x 0,6	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,4 x 0,4	0,3 x 0,3
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,4 x 0,4	0,3 x 0,4	0,2 x 0,3
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,5 x 0,4	0,5 x 0,4	0,4 x 0,3	-
	0,6 x 0,6	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,4 x 0,4	-
	0,6 x 0,6	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,4 x 0,4	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	-	-	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	-	-	-
Grupo Tratamento	0,6 x 0,6	0,5 x 0,6	0,3 x 0,4	0,3 x 0,3	0,2 x 0,2	0,1 x 0,1
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,4	0,3 x 0,4	0,2 x 0,2	0,1 x 0,1	0,0 x 0,0
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,3	0,3 x 0,2	0,2 x 0,1	0,0 x 0,0
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,2 x 0,2	0,1 x 0,1	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,6	0,4 x 0,4	0,2 x 0,2	0,1 x 0,1	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,3 x 0,3	0,2 x 0,2	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,3 x 0,3	-	-	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	-	-	-
Grupo Controle Positivo	0,6 x 0,6	0,5 x 0,6	0,4 x 0,5	0,3 x 0,4	0,2 x 0,2	0,1 x 0,1
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,3 x 0,3	0,1 x 0,1	0,1 x 0,1
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,3 x 0,3	0,2 x 0,1	0,0 x 0,0
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,6	0,4 x 0,5	0,3 x 0,3	0,2 x 0,2	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,5	0,3 x 0,3	0,2 x 0,2	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	0,2 x 0,2	0,2 x 0,2	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,3	-	-	-
	0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,3 x 0,4	-	-	-
0,6 x 0,6	0,5 x 0,5	0,4 x 0,4	-	-	-	

Fonte: dados da pesquisa, 2019.

O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson foi realizado para avaliar a associação linear entre comprimento e largura das feridas do 7º ao 11º dia da coleta de dados, mostrando valores positivos para os três grupos (*cf.* gráfico 1).

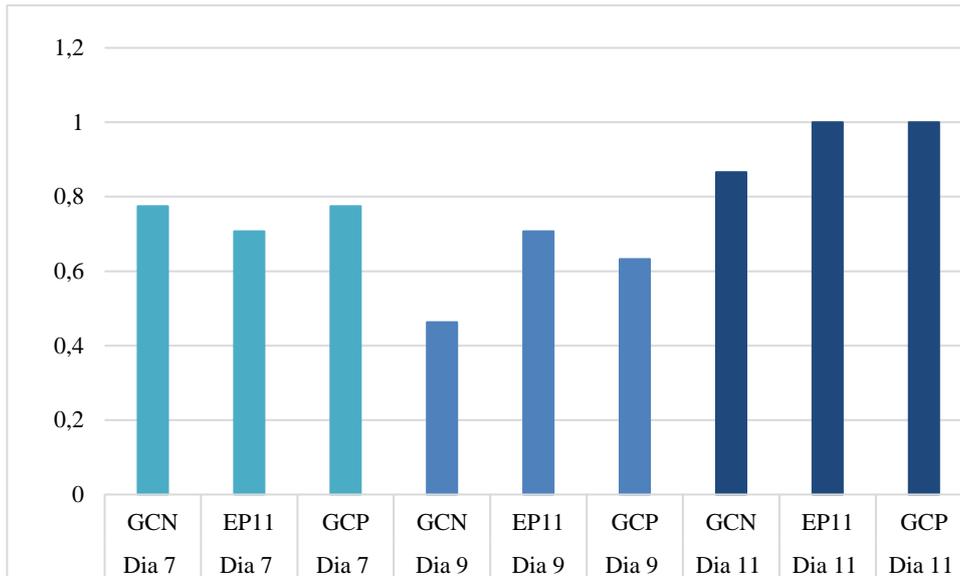


Gráfico 1 – Correlação entre o comprimento e largura das lesões. Brasília-DF, 2019.

Sobre a áreas das lesões no 7º, 9º e 11ºPO, observou-se valores de p menores que 0,05 nos três dias de avaliação ($p = 0,00$ para os dias 7 e 9; $p = 0,03$ para o dia 11), evidenciando o efeito positivo dos grupos estudados na cicatrização das feridas. Na comparação entre as médias das áreas das lesões, também nos dias 7, 9 e 11, foi possível observar diferença significativa entre o Grupo Tratamento (EP11) e Grupo Controle Positivo (GCP) em relação ao Grupo Controle Negativo (GCN), visto que os valores de p também foram menores ou iguais à 0,05 (cf. Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação entre as médias das áreas das lesões entre os três grupos estudados. Brasília-DF, 2019.

Tempo de avaliação (dias)	Tratamento		Média das áreas das lesões (cm ²)	p valor
7	GCN (SF 0,9%)	EP11	0,095	0,00
		GCP	0,068	0,03
9	GCN (SF 0,9%)	EP11	0,108	0,00
		GCP	0,983	0,00
11	GCN (SF 0,9%)	EP11	0,053	0,04
		GCP	0,050	0,05

Fonte: dados da pesquisa, 2019.

Sobre o tempo de cicatrização das lesões, observou-se a ocorrência de cicatrização total em onze dias para 66,66% ($n=2$) das lesões no Grupos Tratamento (EP11) e 33,33% ($n=1$) nas lesões do Grupo Controle Positivo (GCP). Neste mesmo período, 100% dos animais

do Grupo Controle Negativo (GCN) apresentou apenas cicatrização parcial das lesões, ou seja, nenhuma delas havia apresentado epitelização total ao final do experimento (11°PO).

6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Em relação à intensidade do infiltrado inflamatório, realizou-se a comparação entre os três grupos estudados nos dias 7, 9 e 11. No 7° PO foi possível observar grande quantidade de infiltrados inflamatórios (mono e polimorfonucleados) no grupo controle negativo (SF à 0,9%) e moderada quantidade tanto no grupo tratamento (EP11) quanto no controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®), como evidencia o gráfico 2.

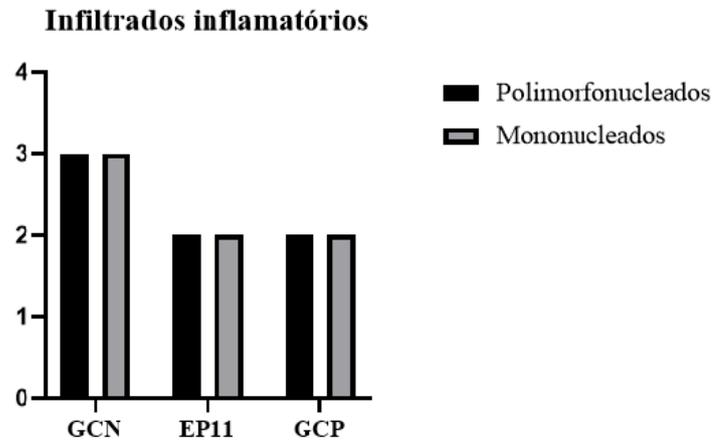


Gráfico 2 – Presença de polimorfonucleados e mononucleados no 7º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®). Brasília-DF, 2019.

No 9º PO, observou-se a presença de quantidade moderada de infiltrados inflamatórios nos três grupos estudados (*cf.* Gráfico 3). No 11º PO foi possível verificar a presença de quantidade moderada de infiltrados inflamatórios apenas no Grupo Controle Negativo, como mostra o Gráfico 4.

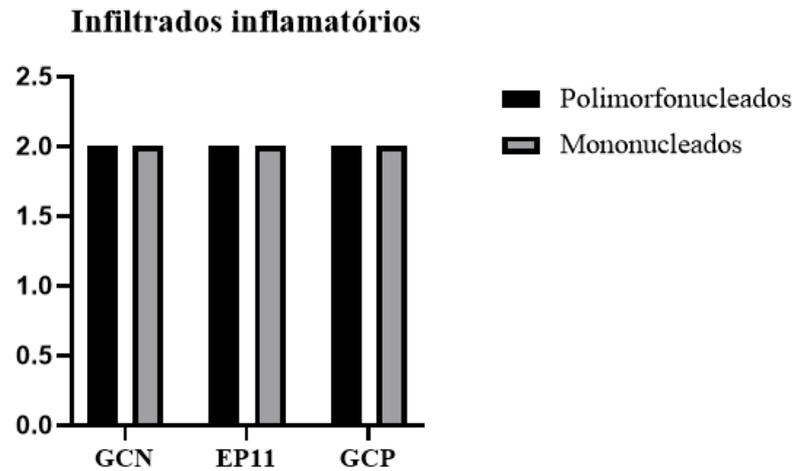


Gráfico 3 – Presença de polimorfonucleados e mononucleados no 9º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®). Brasília-DF, 2019.

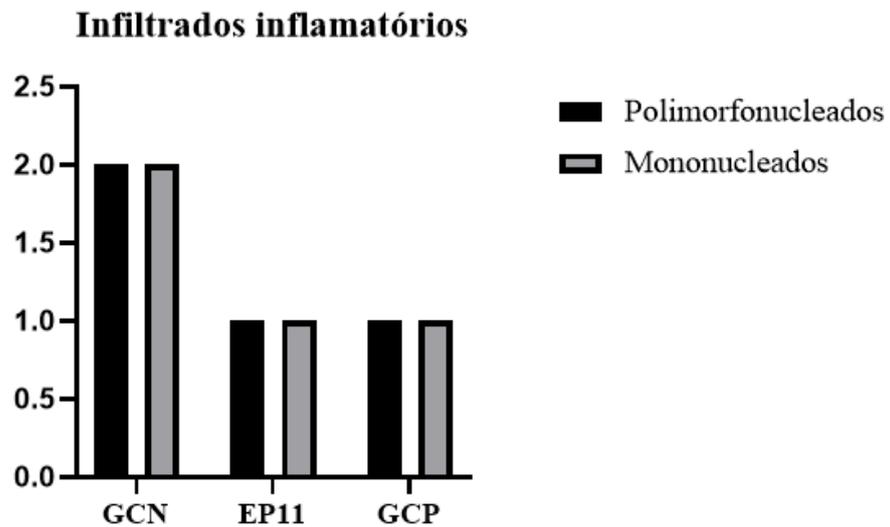


Gráfico 4 – Presença de polimorfonucleados e mononucleados no 11º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®). Brasília-DF, 2019.

Em relação aos fibroblastos, observou-se quantidade moderada para o grupo controle negativo (GCN) nos três dias de avaliação e intensa quantidade para os grupos tratamento (EP11) e controle positivo (GCP) nos dias 7 e 9 (*cf.* Gráfico 5). Houve intensa deposição de colágeno nos grupos tratamento e controle positivo no 7º, 9º e 11º dia de avaliação, conforme evidencia o Gráfico 6.

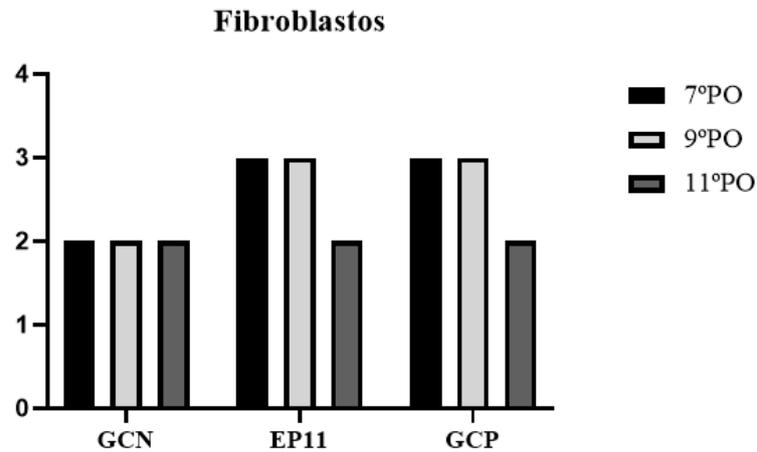


Gráfico 5 – Presença de fibroblastos no 7º, 9º e 11º PO nos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®). Brasília-DF, 2019.

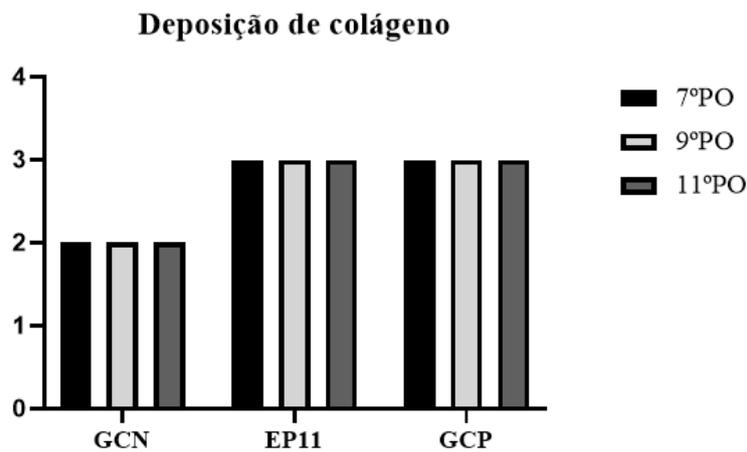


Gráfico 6 – Deposição de colágeno no 7º, 9º e 11º PO nos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®). Brasília-DF, 2019.

Em relação à neovascularização, os grupos tratamento (EP11) e controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®) estimularam a formação dos novos vasos nos dias 7 e 9, como demonstra o Gráfico 7.

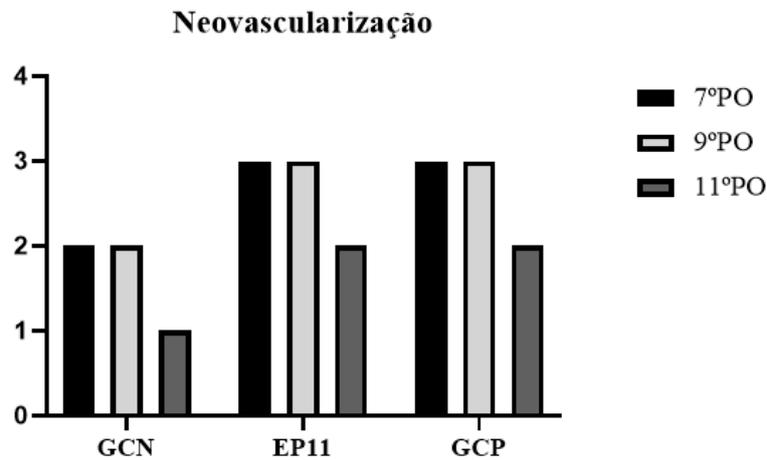


Gráfico 7 – Formação dos novos vasos sanguíneos no 7º, 9º e 11º dia de avaliação dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava *Ostomy Powder*®). Brasília-DF, 2019.

A comparação entre os grupos EP11 e GCP em relação ao placebo (GCN) mostrou significância estatística para as variáveis estudadas na avaliação microscópica, como fibroblastos ($p = 0,00$), síntese de colágeno ($p = 0,00$) e neovascularização ($p = 0,01$). Não foi observada significância estatística na comparação entre os três grupos para a variável definida como infiltrados inflamatórios ($p = 0,06$).

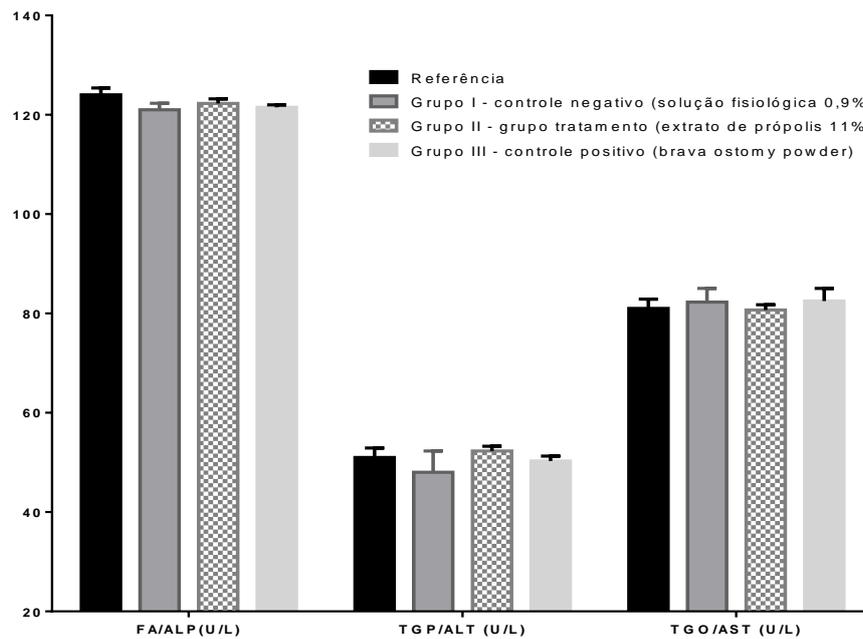
6.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Em relação à análise das enzimas aspartato aminotransferase (TGO/AST), alanina aminotransferase (TGP/ALT) e fosfatase alcalina (FA/ALP), foram observados valores próximos aos adotados como referência (Tabela 3), demonstrando que não houve comprometimento da função hepática dos animais durante a utilização dos produtos nos grupos controle negativo, tratamento e controle positivo.

Tabela 3 – Enzimas hepáticas no plasma dos ratos no GCN, EP11 e GCP. Brasília-DF, 2020.

Parâmetros	Valores de referência*	GCN	EP11	GCP
FA/ALP (U/L)	124,00±6,10(19)	121,00±3,20(9)	122,30±2,20(9)	121,50±3,42(9)
TGP/ALT (U/L)	51,00±12,30(42)	48,00±10,50(9)	52,30±2,35(9)	50,30±1,52(9)
TGO/AST (U/L)	81,00±11,70(38)	82,30±6,70(9)	80,70±2,60(9)	82,50±6,80(9)

*os valores de referência adotados seguem os parâmetros do estudo de Dantas e colaboradores (2006). Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais nos grupos de estudo.



As barras representam as médias; as barras de erro representam o erro padrão. Teste de ANOVA, p -valor > 0,050.

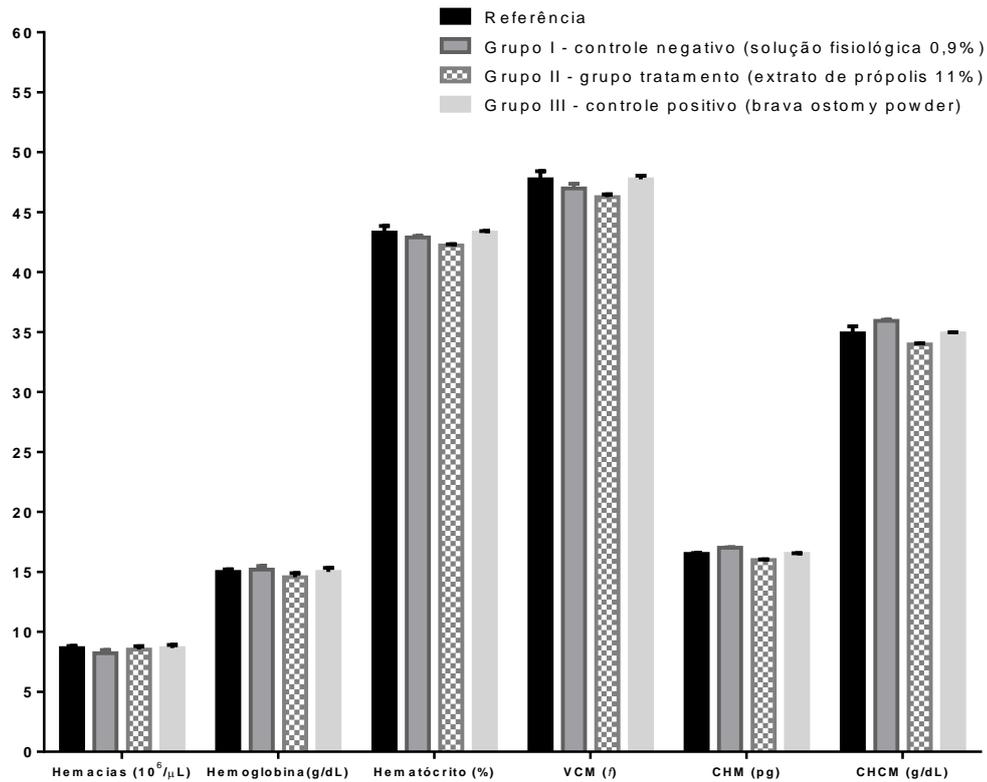
Gráfico 8 – Enzimas hepáticas dos ratos no GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência. Brasília-DF, 2020.

Na análise dos parâmetros correspondentes à série vermelha, observou-se que os três grupos estudados também apresentaram resultados semelhantes aos adotados como valores de referência (Tabela 4). A comparação entre os grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa (*cf.* Gráficos 9 e 10). Os valores correspondentes ao número de plaquetas evidenciam que tanto o produto em pó à base de extrato de própolis verde à 11% quanto o produto comercial apresentaram características anti-inflamatórias.

Tabela 4 – Contagem das células da série vermelha do sangue dos ratos. Brasília-DF, 2020.

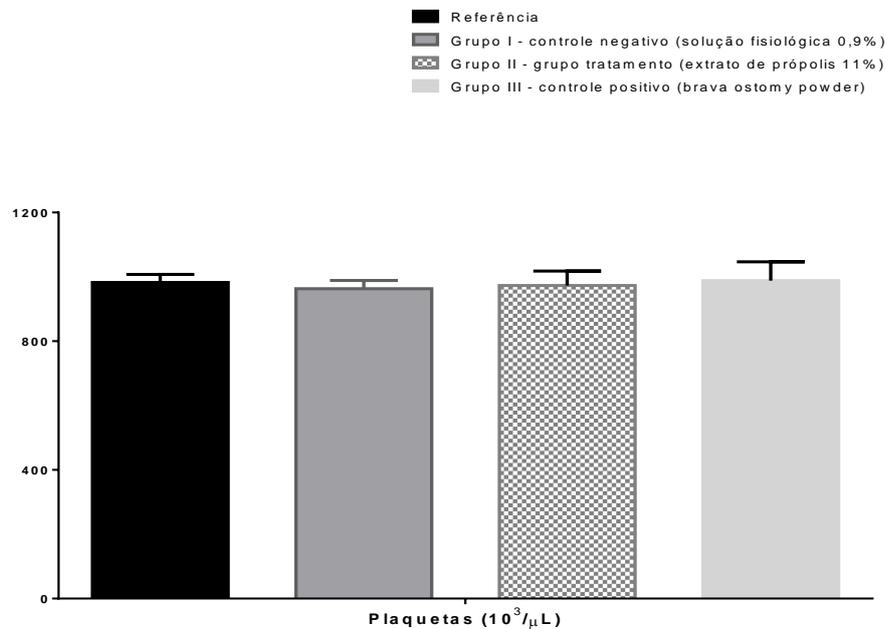
Parâmetros	Valores de referência*	GCN	EP11	GCP
Hemácias ($10^3/\mu\text{L}$)	8,65±1,11(44)	8,23±0,63(9)	8,52±0,69(9)	8,65±0,63(9)
Hemoglobina (g/dL)	15,00±1,45(44)	15,19±0,75(9)	14,56±0,80(9)	15,00±0,82(9)
Hematócrito (%)	43,30±3,51(42)	42,90±0,29(9)	42,23±0,25(9)	43,30±0,29(9)
VCM (f)	47,75±2,89(19)	46,98±0,98(9)	46,25±0,58(9)	47,75±0,73(9)
CHM (pg)	16,51±0,30(17)	17,01±0,12(9)	15,99±0,14(9)	16,51±0,10(9)
CHCM (g/dL)	34,89±2,41(17)	35,93±0,23(9)	33,98±0,22(9)	34,89±0,23(9)
Plaquetas	982,34±167,05(44)	963,25±25,34(9)	973,00±45,23(9)	988,26±47,28(9)

*os valores de referência adotados seguem os parâmetros do estudo de Lima e colaboradores (2014). Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais nos grupos de estudo.



As barras representam as médias; as barras de erro representam o erro padrão. Teste de ANOVA, p -valor $> 0,050$.

Gráfico 9 – Análise do hemograma (série vermelha) dos ratos dos grupos GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência. Brasília-DF, 2020.



As barras representam as médias; as barras de erro representam o erro padrão. Teste de ANOVA, p -valor $> 0,050$.

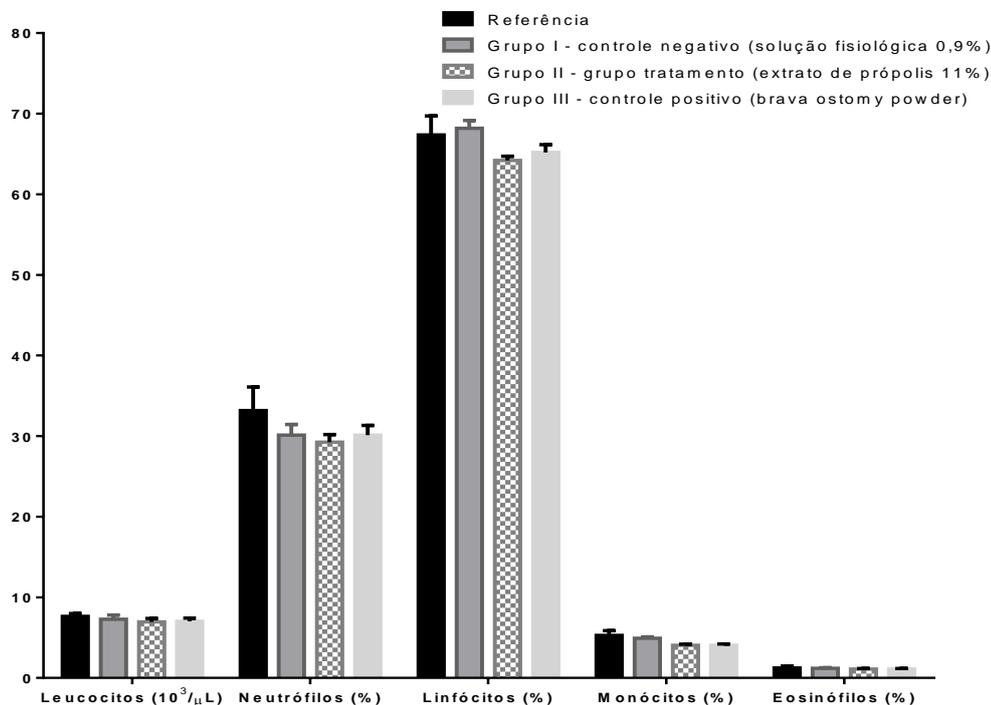
Gráfico 10 – Análise das plaquetas (série vermelha) dos ratos dos grupos GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência. Brasília-DF, 2020.

No que diz respeito à série branca, os valores também foram semelhantes aos valores de referência (Tabela 5) nos 3 grupos. A comparação entre os grupos estudados não mostrou diferença estatística significativa para este parâmetro de avaliação (Gráfico 11), demonstrando que não houve presença de processos inflamatórios ou infecciosos, sendo o resultado do produto em pó à base de própolis similar ao produto comercial.

Tabela 5 – Contagem das células da série branca do sangue dos ratos. Brasília-DF, 2020.

Parâmetros	Valores de referência*	GCN	EP11	GCP
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,63±2,37(44)	7,29±1,25(9)	6,96±0,99(9)	7,01±1,1(9)
Neutrófilos (%)	33,16±14,99(26)	30,12±3,25(9)	29,25±2,30(9)	30,12±2,42(9)
Linfócitos (%)	67,36±15,31(42)	68,20±2,35(9)	64,20±1,25(9)	65,20±1,52(9)
Monócitos (%)	5,27±3,52 (34)	4,93±0,38(9)	4,04±0,35(9)	4,05±0,36(9)
Eosinófilos (%)	1,25±1,09(24)	1,18±0,18(9)	1,08±0,18(9)	1,09±0,19(9)

*os valores de referência adotados seguem os parâmetros do estudo de Lima e colaboradores (2014). Os valores entre parênteses correspondem ao número de animais nos grupos de estudo.



As barras representam as médias; as barras de erro representam o erro padrão. Teste de ANOVA, p -valor > 0,050.

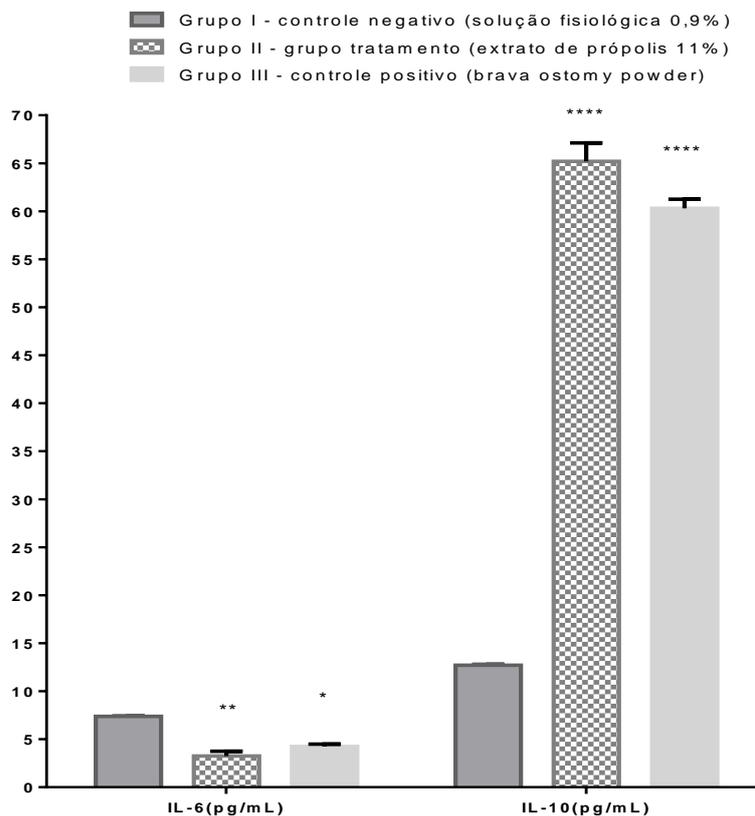
Gráfico 11 – Análise do hemograma (série branca) dos ratos dos grupos GCN, EP11 e GCP, comparados aos valores de referência. Brasília-DF, 2020.

No que concerne ao perfil inflamatório, foi observada diminuição significativa dos valores de interleucina 6 (IL-6) do grupo tratamento e do grupo controle positivo, quando comparados ao grupo controle negativo (Tabela 5). O aumento dos valores de IL-10 observados nos grupos tratamento e controle positivo mostraram resultado satisfatório em relação à resposta inflamatória quando comparados ao grupo controle negativo (Gráfico 12).

Tabela 6 – Média e desvio padrão dos parâmetros de perfil inflamatório dos animais do GCN, EP11 e GCP. Brasília-DF, 2020.

Parâmetros	GCN	EP11	GCP
IL-6(pg/mL)	7,39±0,12(9)*	3,25±1,20(9)*	4,25±0,60(9)*
IL-10(pg/mL)	12,70±0,30(9)*	65,20±4,70(9)*	60,30±2,35(9)*

*os valores entre parênteses correspondem ao número de animais nos grupos de estudo.



As barras representam as médias; as barras de erro representam o erro padrão. Teste de ANOVA, *Post Hoc* Dunnet: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Gráfico 12 – Perfil inflamatório dos animais do GCN, EP11 e GCP. Brasília-DF, 2020.

Discussão

6. DISCUSSÃO

O avanço tecnológico que envolve o tratamento de feridas ainda configura um desafio para os enfermeiros, dada a disponibilidade de diversos produtos, sua distribuição e diferentes respostas dos indivíduos frente à conduta estabelecida. O uso de ratos em pesquisas que visem a avaliação da reparação cutânea se justifica, apesar das diferenças imunológicas e morfológicas, pela similaridade das fases de cicatrização como a fase inflamatória, proliferativa e de remodelação (ZOMER; TRENTIN, 2018).

O processo de reparação tecidual ocorre a partir de eventos moleculares, celulares e bioquímicos coordenados, didaticamente descritos na literatura em etapas interdependentes (fase inflamatória, proliferativa e de remodelação). Trata-se de um processo dinâmico, sistêmico e que está diretamente relacionado às condições gerais do organismo (SOUZA; CASTRO; SILVA, 2021). No presente trabalho, os animais foram avaliados pelos médicos veterinários responsáveis pelo biotério durante todo o experimento e não apresentaram alterações comportamentais ou clínicas que inviabilizassem o andamento da pesquisa.

Cabe destacar que, no presente estudo, os animais permaneceram com as lesões expostas durante toda a coleta de dados devido à dificuldade para realização do curativo oclusivo. Desta forma, optou-se por alojar três animais em cada gaiola para que eles socializassem entre si, mas reduzisse a possibilidade de retirada dos produtos aplicados nas lesões. Após a limpeza das lesões e aplicação dos produtos em teste, as pesquisadoras permaneceram no biotério por mais uma hora, para observar o comportamento dos animais e garantir que o produto ficaria em contato com a lesão o maior tempo possível.

A manutenção da umidade das feridas é obtida por meio dos curativos oclusivos. As lesões em que ocorre o ressecamento do leito apresentam alterações na produção dos fatores de crescimento que estimulam a angiogênese e a epitelização, levando à formação de tecido desvitalizado (necrose) pela hipóxia, retardando o processo de reparação tecidual (BORGES *et al*, 2010). A presença de crostas no leito das lesões a partir do 3ºPO e de tecido necrótico encontrado em alguns animais a partir do 7º PO pode ter ocorrido, em parte, pela exposição das lesões ao ambiente.

Um estudo pré-clínico realizado com camundongos avaliou o uso de diferentes produtos para fixação de curativos, como atadura de crepom, bandagem autoaderente, fita microporosa e filme de poliuretano transparente. Amorim e colaboradores (2021) definiram

que a melhor fixação foi aquela realizada com o filme de poliuretano transparente, aplicado sobre a cobertura primária, medindo 3 cm de comprimento e 15 cm de largura (vertical x horizontal), uma vez que proporcionou a integridade do curativo por 48 a 96 horas. Sugere-se que, em estudos realizados com animais futuramente, sejam aplicadas as coberturas em teste ocluídas com filme transparente, visando contemplar todos os princípios do curativo ideal amplamente descritos na literatura.

Em relação à análise macroscópica das feridas cirúrgicas induzidas nos animais utilizados neste estudo, os dados obtidos sobre o efeito cicatrizante foram considerados satisfatórios tanto para o grupo tratado com o produto em pó à base de própolis verde quanto para o grupo em que se utilizou o Brava *Ostomy Powder*®, que se trata de um produto comercial já utilizado para tratamento de lesões de pele em humanos. No 11º PO foi identificado um número maior de animais com cicatrização total no grupo EP11 em relação ao grupo controle positivo (GCP), demonstrando eficácia ligeiramente maior da própolis verde neste quesito avaliado.

O uso de coberturas formuladas em pó tem sido utilizado pelos profissionais de saúde para o tratamento de feridas. A carboximetilcelulose presente nas coberturas em pó forma um gel na presença do exsudato da ferida, preenchendo os espaços presentes no leito das lesões superficiais ou profundas e reduzindo o risco de dano aos tecidos viáveis (BORGES *et al*, 2010).

Um estudo realizado em 2021 comparou a taxa de cicatrização em pacientes diabéticos com úlcera nos pés utilizando-se biomembrana de proteína do látex e hidrocoloide em pó. Os resultados mostraram taxa de cicatrização semelhantes para ambos os produtos, evidenciando que não houve prejuízo no processo cicatricial tanto no grupo experimental quanto no grupo controle (COELHO *et al*, 2021).

No presente estudo, o uso dos produtos com apresentação em pó no grupo experimental (EP11) e no controle (GCP) não demonstrou efeitos negativos significativos no processo de reparação tecidual, uma vez que foi observada apenas a formação de crostas recobrando parcialmente o leito das lesões nos dois grupos, sendo a remoção realizada por desbridamento mecânico durante as trocas de curativo.

No que concerne ao tempo de cicatrização, a maioria das lesões tratadas com o produto em pó à base de própolis verde cicatrizaram em 11 dias, confirmando dados de outros

estudos publicados que utilizaram esta resina, mostrando um tempo de cicatrização total variando entre 10 e 15 dias (MEZADRI *et al*, 2009; BATISTA *et al*, 2012). Os resultados evidenciaram que o tempo de cicatrização das lesões seguiu o padrão esperado para as lesões agudas, em que ocorre realinhamento das fibras de colágeno e maior resistência do tecido neoformado a partir do 10º dia (GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; SOUZA; CASTRO; SILVA, 2021).

A avaliação das áreas das lesões e a comparação entre as médias das áreas revelou o efeito positivo tanto do grupo tratamento (EP11) quanto do grupo controle positivo (GCP) na cicatrização das feridas, uma vez que se observou uma redução progressiva das áreas ao longo dos dias.

A mensuração das lesões de pele também é considerada um parâmetro importante de avaliação dos enfermeiros quanto ao potencial de cicatrização e a resposta ao tratamento implementado. Diversas técnicas podem ser utilizadas para acompanhamento da evolução das feridas, como a mensuração por meio de decalque em folhas de acetato, uso de régua descartáveis ou por meio de programas computacionais desenvolvidos para esta finalidade, que analisam os registros fotográficos das lesões nas diferentes etapas do processo cicatricial (MEHL *et al*, 2020; EBERHARDT *et al*, 2015). Independentemente do método utilizado, é importante que os avaliadores mantenham a técnica durante todo o processo de reparação tecidual, para preservar a padronização, objetividade e acurácia da avaliação.

Na análise microscópica, observou-se que os produtos usados no grupo EP11 e o GCP foram biocompatíveis, não exercendo efeitos deletérios sobre as lesões, como presença de reações inflamatórias intensas e prolongadas. Alguns estudos descrevem os efeitos anti-inflamatórios da própolis, como sua capacidade de atuação na redução do edema e a quimiotaxia de células importantes para o processo biológico de reparação tecidual (RAHAL *et al*, 2003; TORRES *et al*, 2021). As reações inflamatórias observadas nos grupos experimental e controle positivo variaram de leve a moderada, diferente da resposta moderada a intensa observada no grupo controle negativo, evidenciando o efeito benéfico da utilização tanto do produto criado para este estudo quanto do produto comercial sobre a resposta inflamatória nas lesões dos animais estudados.

Após a ocorrência da solução de continuidade na pele, observa-se a migração imediata das células polimorfonucleadas que, além de realizar a fagocitose dos microrganismos com potencial patógeno e do tecido desvitalizado, estimulam a liberação de fatores de crescimento,

quimiocinas e citocinas que favorecem a proliferação e a migração dos fibroblastos a partir das margens da ferida (BORGES *et al*, 2010; GAMBA; PETRI; COSTA, 2016; SOUZA; CASTRO; SILVA, 2021). O grupo EP11 e GCP mostrou um fluxo equilibrado de polimorfonucleados e mononucleados no 7º, 9º e 11º PO, indicando migração celular adequada ao longo do tratamento, o que favoreceu o processo de organização do tecido de granulação e, conseqüentemente, a cicatrização das lesões.

Ainda sobre a análise microscópica, os resultados observados na avaliação da presença de fibroblastos, deposição de colágeno e neovascularização para os grupos EP11 (experimental) e GCP (controle) demonstraram os efeitos positivos dos dois produtos testados em relação à reparação tecidual. Na fase de proliferação, os fibroblastos produzem colágeno tipo III que, com auxílio das células mononucleares (macrófagos) vão se transformar em colágeno tipo I e conferir resistência ao sistema tegumentar, uma vez que são responsáveis pela reparação do tecido conjuntivo e fornecem sustentação às células da epiderme, sendo tais fatores importantes no processo de cicatrização de feridas agudas ou crônicas (MEDEIROS, 2021; OLIVEIRA; SILVA; PINTO, 2021; BORGES *et al*, 2010).

Neste estudo, as respostas observadas no grupo experimental (EP11) e controle positivo (GCP) permitiram inferir que ambos os produtos apresentaram propriedades cicatrizantes, uma vez que favoreceram a proliferação dos fibroblastos, síntese de colágeno e angiogênese. Foi possível constatar uma resposta discretamente superior no grupo tratado com a própolis verde, uma vez que 66,66% dos animais deste grupo tiveram suas feridas cicatrizadas no 11º PO.

A análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos ratos submetidos aos dois tratamentos (EP11 e Brava *Ostomy Powder*®) em comparação ao placebo (GCN), observadas pequenas variações, revelou similaridade com os valores encontrados em outros estudos (LIMA *et al*, 2014; DANTAS *et al*, 2006).

Na análise das enzimas aspartato aminotransferase (AST/TGO), alanina aminotransferase (ALT/ TGP) e fosfatase alcalina (ALP/ FA), foram observados que os valores se mantiveram dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie estudada, mostrando que não houve comprometimento da função hepática que sugerisse toxicidade após o uso dos produtos testados nesta pesquisa (ROBERTO *et al*, 2018).

No que diz respeito a análise da série branca, foi observado que não houve presença de processos infecciosos ou processos inflamatórios prolongados, uma vez que os valores apresentados pelos três grupos de estudo foram similares aos valores de referência, evidenciando os efeitos positivos tanto do produto em pó à base de extrato hidroalcolico de própolis à 11% quanto do produto comercial (Brava *Ostomy Powder*®) para evitar o prolongamento da fase inflamatória, que é um dos fatores responsáveis pelo retardo no processo cicatricial devido à produção de endotoxinas.

Anjum e colaboradores (2019) descrevem que, no caso da própolis, tal fenômeno se deve principalmente à presença dos flavonoides, uma vez que estes compostos restringem a produção de prostaglandinas e leucotrienos pelas células de defesa, além de retardar a atividade das enzimas mieloperoxidase, ornitina descarboxilase (OCD), tirosina quinases (PTKs), entre outras. Os dados observados na presente pesquisa corroboram com outros estudos que demonstram a atividade imunomoduladora e anti-inflamatória da própolis (MACHADO *et al*, 2016; RAMOS; MIRANDA, 2007; FILHO *et al*, 2021; ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018).

Na análise da série vermelha, destacam-se os resultados relacionados à hemoglobina, uma vez que este é o principal veículo de transporte de oxigênio e sua deficiência pode indicar um efeito das citocinas inflamatórias. A síntese de colágeno depende da oxigenação das células e da hidroxilação da lisina e prolina, mediada pela enzima produzida pelos fibroblastos associados às vitaminas (A, C e E), zinco, ferro, entre outros nutrientes (NEIVA *et al*, 2014; MEDEIROS; FILHO, 2016). Neste estudo, foi possível observar que os níveis de hemoglobina dos três grupos de ratos estudados foram semelhantes ao valor de referência considerado para esta pesquisa, sendo este um fator relevante para o processo de cicatrização de lesões de pele, uma vez que o oxigênio é essencial para a formação do tecido de granulação e o transporte de nutrientes.

Cabe destacar ainda que as plaquetas, além de outros fatores do plasma sanguíneo, promovem a coagulação do sangue formando um tampão hemostático e secretando mediadores químicos, bem como fatores de crescimento importantes para o processo de reparação tecidual, como TGF- β , FGF, PDGF, prostaglandinas, tromboxanas, entre outros. Os níveis séricos de plaquetas elevados podem indicar a presença de processo inflamatório, uma vez que as células endoteliais, quando mediadas por fatores inflamatórios, bem como as células mono e polinucleadas, eosinófilos, basófilos produzem o fator de ativação de

plaquetas (PAF) que promovem agregação plaquetária e ativação de leucócitos (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; SOUZA; CASTRO; SILVA, 2021; FERREIRA, 2006). A análise deste parâmetro do grupo tratado com pó à base de extrato hidroalcolólico de própolis verde revelou resposta satisfatória na ação anti-inflamatória, com resultados similares ao produto comercial utilizado para comparação.

Em relação ao perfil inflamatório, foi observada diminuição significativa dos valores de interleucina 6 (IL-6) do grupo tratamento (EP11) e do grupo controle positivo (GCP), quando comparados com o grupo controle negativo (GCN). A IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente pelas células B, T e monócitos. Em conjunto com a TNF- α e a IL-1 β , a IL-6 influencia a resposta imune na presença de reações inflamatórias, mediando a migração dos neutrófilos e dos macrófagos para a lesão (MOTTA *et al*, 2014; SCHELLER *et al*, 2011; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). A diminuição estatisticamente significativa também demonstra a eficácia anti-inflamatória ligeiramente superior do produto em estudo (EP11) em comparação ao Brava *Ostomy Powder*®.

A IL-10 é considerada uma citocina anti-inflamatória, produzida por macrófagos e monócitos, que atua diminuindo citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , entre outros) e regulando o sistema imune, uma vez que diminui a infiltração dos neutrófilos e macrófagos na lesão a partir da redução das proteínas MCP-1 e proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α) (MOTTA *et al*, 2014; KIERAN *et al*, 2013).

No presente estudo, o aumento estatisticamente significativo dos valores de IL-10 observados nos grupos tratamento e controle positivo evidenciou igualmente um resultado satisfatório em relação à resposta inflamatória, inibindo o processo inflamatório crônico e auxiliando na reparação tecidual das lesões dos animais.

Os curativos ideais são aqueles que, notadamente, apresentem características como estabilidade prolongada, fácil aplicação e remoção, prevenção de contaminação da lesão, promoção da formação adequada do tecido de granulação, entre outros. Apesar de não ter sido realizada a coleta de amostras específicas para análise da presença de microrganismos patogênicos, a ausência de sinais clínicos de infecção nas lesões e os resultados obtidos nesta pesquisa permitem inferir que o uso do produto em pó a base de própolis verde inibiu de certa forma a proliferação de microrganismos que pudessem causar um processo infeccioso nos 11 dias de avaliação.

Os achados deste estudo possibilitam a realização de ensaios clínicos para avaliação da segurança e eficácia em seres humanos (estudos *in vivo*) ou com células humanas (estudos *in vitro*), como alternativa para o tratamento de feridas agudas e/ou crônicas.

Destacamos como limitação do estudo o fato das lesões cirúrgicas terem permanecido expostas durante a coleta de dados pela impossibilidade de oclusão com coberturas secundárias na ocasião, o que pode ter favorecido a formação de crostas e necrose em alguns animais pela exposição do tecido de granulação neoformado, provocando certo grau de ressecamento do leito da ferida, além de permitir maior exposição aos microrganismos presentes no ambiente e redução do tempo de contato dos produtos testados com as lesões.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa experimental evidenciaram que o uso tópico do produto formulado à base de extrato hidroalcoólico própolis verde na concentração de 11%, interferiu de maneira positiva no processo de cicatrização das lesões cirúrgicas induzidas nos animais, evidenciado pela análise macroscópica e histológica das feridas, bem como apresentou efeitos anti-inflamatórios sem provocar toxicidade, como mostrou a análise hematológica e bioquímica, podendo ser considerado um curativo potencial para o tratamento de feridas agudas.

Apesar de existirem relatos na literatura sobre o uso da própolis em seres humanos com efeitos satisfatórios no processo de cicatrização de lesões de pele, há a necessidade de elaboração de ensaios clínicos randomizados para uma indicação segura das formulações à base de própolis verde para o tratamento de feridas.

Referências

8. REFERÊNCIAS

ABREU, J.A.C. et al. Análise histológica da cicatrização de feridas cutâneas experimentais sob ação do laser de baixa potência. **Scientia Medica**, Porto Alegre, 2011; 21(3): 96-100.

ABU-SEIDA, A.M. Effect of propolis on experimental cutaneous wound healing in dogs. **Veterinary Medicine International**, 2015; article ID 672643, p.1-4.

ALBUQUERQUE, E.R.; ALVES, E.F. Análise da produção bibliográfica sobre qualidade de vida de portadores de feridas crônicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, 2011; 4(2): 147-52.

ALVES, A.Q. et al. Comparação de quatro métodos para avaliação morfométrica de feridas. **Research, Society and Development**, 2022; 11(5): e17611528187. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28187>.

AMORIM, G.L. et al. Contribuições do enfermeiro na pesquisa básica: modelo de fixação de curativos em feridas cutâneas excisionais de camundongos. **ESTIMA**, Braz J. Enterostomal Ther., 2021; 19: e1221. DOI: https://doi.org/10.30886/estima.v19.1038_PT.

ANJUM, S.I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): a review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2019; 26(1):1695-1703.

BARACHO, N.C.V. et al. Extrato hidroalcoólico de própolis e cicatrização de feridas no diabetes tipo I: estudo experimental. **Revista Científica Universitas**, Minas Gerais, 2009; 2(2): 1-3.

BARBOSA, M.H.; ZUFFI, F.B.; MARUXO, H.B.; JORGE, L.L.R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul Enferm**, 2009; 22(3): 318-22.

BARUD, H.S. et al. Antimicrobial brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membrane as promising biomaterial for skin wound healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013; Article ID 703024, 10 pages.

BATISTA, L.L.V. et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced rats. **Rev Col Bras Cir.**, 2012; 39(6): 515-520.

BATISTA, E.K.F. et al. Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. **Rev Bras PI Med.**, 2015; 17(3): 413-419.

BEITZ, J. et al. Content validation of a standardized algorithm for ostomy care. **Ostomy Wound Management**, 2010; 56(10): 22-38.

BORGES, E.L. et al. **Feridas**: como tratar. 2. ed. Belo Horizonte: Editora Coopmed, 2010.

BORGES, E.L.; RIBEIRO, M.S.; DONOSO, M.T.V. Revisão integrativa da ação da própolis em lesões cutâneas. **Rev Estima**, 2011; 9(4): 1-8.

BOSIO, G. et al. A proposal for classifying peristomal skin disorders: results for a multicenter observational study. **Ostomy Wound Management**, 2007; 53(9): 38-43.

BRAGA, J.H. **Avaliação da qualidade de pó para ostomia à base de própolis**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em farmácia), Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2018.

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

CARDINELLI, C.C. et al. Instrumento para avaliação de feridas: scoping review. **Research, Society and Development**, 2021; 10(1): e144101119246.

CHEN, L. et al. Determination of phenolic compounds in Chinese poplar propolis, Brazil green propolis and poplar gum by high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and preliminary study of the identification of adulteration. **Chinese**, 2019; 37(1): 40-45.

COELHO, J.M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Rev Col Bras Cir.**, 2010; 37(1): 045-051.

COELHO, M.M.F. et al. Taxa de cicatrização em úlceras do pé diabético tratadas com biomembrana e hidrocoloide em pó: ensaio clínico randomizado. **ESTIMA, Braz. J. Enterostomal Ther.**, 2021; São Paulo, 19(1): e06121. Disponível em: <https://doi.org/10.30886/estima.v19.986> PT.

CORREA, F.R.S.; SCHANUEL, F.S.; NUNES, N.M.; COSTA, A.M.A.; DALEPRANE, J.B. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFkB. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017; 86: 162-171.

COUTINHO JÚNIOR, N.F.L. et al. Ferramenta TIME para avaliação de feridas: concordância interobservador. **ESTIMA Braz J Enterostomal Ther.**, 2020; 18(1): e1720. Disponível em: https://doi.org/10.30886/estima.v18.875_PT.

CRESWELL, J.W. **Projeto de pesquisa: método qualitativo, quantitativo e misto**. Tradução: Magda Lopes. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANTAS, J.A et al. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci. Health Sciences**, 2006; 28(2): 165-170.

DEALEY, C. **Cuidando de feridas** – um guia para enfermeiras. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

DOMANSKY, R.C.; BORGES, E.L. **Manual para prevenção de lesões de pele** – recomendações baseadas em evidências. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

DOWSETT, C. et al. Triangle of wound assessment made easy. **Wounds International**, 2015; p. 1-6. Disponível em: <https://www.woundsinternational.com/resources/details/triangle-of-wound-assessment-made-easy>.

EBERHARDT, T.D. et al. Mensuração de Feridas: revisão da literatura. **Ciência & Saúde**, 2015; 8(2): 79-84.

EURIDES, D. et al. Efecto del extracto de óleo de Rosa Mosqueta (Rosa aff Rubiginosa) en la cicatrización de heridas cutáneas. **Revista Electrónica de Veterinaria**, 2011; 12(1): 1-10.

FALANGA, V. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. **Blood Cells Mol Dis.**, 2004; 32(1): 88-94.

FERREIRA, M.A.N.D. **Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção gênica dos receptores para o PAF (PAFR-KO)**. Tese de Doutorado. Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais-MG, 2006.

FIGUEIREDO, S.M. et al. Physicochemical Characteristics of Brazilian Green Propolis evaluated During a Six-Year Period. **Current Drug Discovery Technologies**, 2016; 14(2): 127-134.

FILHO, E.D. et al. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* D.C contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Development**, 2021; 7(1): 5830-5848.

GAMBA, M.A.; PETRI, V.; COSTA, M.T.F. **Feridas** – prevenção, causas e tratamento. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

GARROS, C.I. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 2006; 21(3), p. 55-65.

GARTNER, L.P. **Tratado de histologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

GEOVANINI, T. **Tratado de feridas e curativos: enfoque multiprofissional**. São Paulo: Editora Rideel, 2014.

GUIMARÃES, M.V.; FREIRE, J.E.C.; MENEZES, L.M.B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Rev Bioét** (impr), 2016; 24(2): 217-24.

HOOIJMANS, C.R. et al. SYRCLES's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, 2014; 14(43): 1-9. Available from: <https://bmcmedresmethodol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2288-14-43>.

JACOB, A. et al. The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2015; 15: 294-304.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

KHEIT, S. Wound bed preparation: bacterial imbalance in chronic wounds. **Wounds**, 2003; 15(7): 8-14.

KIERAN, I. et al. Interleukin-10 reduces scar formation in both animal and human cutaneous wounds: results of two preclinical and phase II randomized control studies. **Wound Repair and Regeneration**, 2013; 21(1): 428-36.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 1977; 33(1): 159-74.

LAVINAS, F.C. et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2019; 19(1): 389-399.

LIMA, A.T.A. **Avaliação do potencial antibacteriano da própolis frente Staphylococcus aureus**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em medicina), Faculdade de Ciências Gerenciais de Munhuaçu, 2018.

LIMA, C.M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, 2014; 10(3): 1-9.

LIMA, G.K.S. et al. Identificação de microrganismos para controle de infecção em feridas crônicas. **Research, Society and Development**, 2021; 10(8): e56210817312. Disponível em: [dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17312](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17312).

LIMA, N.E.P. et al. Laserterapia de baixa intensidade no tratamento de feridas e atuação da enfermagem. **Rev Enferm UFPI**, 2018; jan/mar, 7(1): 50-6. Disponível em: <https://revistas.ufpi.br/index.php/reufpi/article/view/6223>.

LIMA, N.C.A. et al. Propolis increases neutrophils response against *Candida albicans* through the increase of reactive oxygen species. **Future Microbiology**, 2018; 13(1): 221-230.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 2008; 18(3): 447-454.

MACHADO, B.S.; PULCINO, T.N.; SILVA, A.L.; MELO, D.T.; SILVA, R.G.; MENDONÇA, I.G. Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity. **J Apither.**, 2016; 1(2): 47-50.

MAGALHÃES, T.V.; LOT, R.F.E.; DEL CARRATORE, C.R. Analysis of antibacterial action of propolis and standardization of volumes through antibiogram. **UNIMAR Ciências**, 2016; Marília-SP, 25(1-2): 38-44.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **An Bras Dermatol.**, 2003; 78(4): 393-410.

MARCONI, M.A.; LAKATOS, E.M. **Técnicas de pesquisa**. 9. ed. São Paulo: Atlas, 2021.

MARQUES, R.G. **Técnica operatória e cirurgia experimental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MEDEIROS, M.M.M. Efeitos *in vitro* da papaína em fibroblastos humanos oriundos de pele. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2021.

MEDEIROS, A.C.; FILHO, A.M.D. Cicatrização de feridas cirúrgicas. **J Surg CI Res**, 2016; 7(2): 87-102. Disponível em: <https://periodicos.ufrn.br/jscr/article/view/11438/8049>

MEHL, A.A.; SCHNEIDER JR, B.; SCHNEIDER, F.K.; CARVALHO, B.H.K. Mensuração da área de feridas para análise precoce do fator preditivo cicatricial. **Rev Latino-Am Enfermagem**, 2020; 28e:3299.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.**, 2009; 84(3): 257-62.

MEZADRI, T.J.; LEITE, M.F.; STAACK JÚNIOR, M.C.; COLCHON, P.H.; BALAN, A.B.; ZANATTA, M.L. et al. Evaluation of the contraction of cutaneous wounds in wistar rats treated with Brazilian green propolis gel. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2009; 28(5): 762-7.

MOHER, D. et al. Preferred report items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **Ann Intern Med**, 2009 [internet]; 151(4): 264-9.

MOTTA, Y.P. et al. Quantificação de citocinas no soro e homogenato da pata na intoxicação experimental com veneno de *Bothropoides jararaca* em ratos Wistar tratados com soroterapia e *Mikania glomerata*. **Arq Bras Med Vet Zootec.**, 2014; 66(5), 1413-1418.

NEVES, S.M.P. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

NICOLETTI, M.A. et al. Uso popular de medicamentos contendo drogas de origem vegetal e/ou plantas medicinais: principais interações decorrentes. **Rev Saúde**, 2010; 4(1): 25-39.

NEIVA, G.P. et al. Alterações dos parâmetros hematológicos em pacientes portadores de úlcera por pressão em um hospital de longa permanência. **Einstein**, 2014; 12(3): 304-9.

OLIVEIRA, K.A.M. et al. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, 2012; 33(2): 211-222.

OLIVEIRA, N.R.; SILVA, I.A.; PINTO, R.R. Colágeno: uma breve revisão. **Brazilian Journal of Development**, 2021; 7(11): 103346-103355. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n11-112>.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Potencial role of propolis in wound healing: biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2018; 98(1): 469-483.

PAWLINA, W.; ROSS, M. **Histologia**: texto e atlas. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020.

PROSPERO. International Prospective Register of Systematic Reviews. 2020. Available from: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?ID=CRD42020187904.

RAHAL, S.C. et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Arch Vet Sci**, 2003; 8(1): 61-67.

RAMOS, A.; MIRANDA, J.D. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins Inc. Trop. Dis.*; 2007; 13(4): 697-710. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1678-91992007000400002>.

ROBERTO, J.V.B. et al. Parâmetros bioquímicos de referência de ratos wistar de diferentes faixas de peso, provenientes do biotério das Faculdades Nova Esperança-PB. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, 2018; 16(1): 81-87.

ROJCZYK, E. et al. Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by polish studies. **Journal of Ethnopharmacology**, 2020; v.262: 113159. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113159>.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **eCAM**, 2005; 2(1):33-38.

SALGUEIRO, F.B.; CASTRO, R.N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis. **Quim. Nova**, 2016; 39(10): 1192-1199.

SANTOS, T.M.M. **Preparação e caracterização de partículas de Eudragit® L100 contendo nifedipino e comparação de parâmetros cinéticos com cápsulas comerciais de nifedipino.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco. Programa de Pós-graduação em Ciências dos Materiais, Juazeiro-BA, 2013.

SANTOS, W.B. et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Rev SOBECC**, 2016; 21(1): 46-51.

SCHELLER, J. et al. The pro and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochemica et Biophysica Acta**, 2011.; 1813(1): 878-888.

SILVA, J.O.; PIMENTEL, K.G.B.; SANTOS, E.B.O.; OLIVEIRA, V.M.L.; FERNANDES, F.H.A. HET-CAM test as an alternative for toxicological evaluation of ophtalmic products. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, 2021; 17(2): 430-442.

SILVA, J.T.F.A. **Desenvolvimento de pó cicatrizante à base de propolis para tratamento de complicações da pele periestomal.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Brasília-DF, 2020.

SILVA, S.A.O.; MARTINS, F.S.; SILVA, A.S.; GHELEN, M.H.; DIAZ, C.M.G.; MARTINS, E.S.R. O enfermeiro no diagnóstico e tratamento de biofilmes em feridas. **Disciplinarum Scientia**, 2018; 19(2): 281-290.

SOUZA, R.F. et al. Efficacy of a propolis solution for cleaning complete dentures. **American Journal of Dentistry**, 2019; 32(6): 306-310.

SOUZA, P.G.; CASTRO, M.S.; SILVA, L.P. A biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele. **Brazilian Journal of Development**, 2021; 7(3): 28989-29010. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/26781/21202>.

STAAK JÚNIOR, M.C.; COLCHON, P.H.; PORTES, A.G.; MEZADRI, T.J.; TAMES, D.R.; ANDRADE, S.F. Histological evaluation on brazilian green propolis effect in tissue repair of wistar rats cutaneous wounds. **Latin American Journal of Pharmacy**, 2011; 30(2): 383-7.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2014; 6(1): a016295.

TAVARES, L.C. et al. Estudo químico de uma amostra de própolis verde de Passa Quatro, Minas Gerais, Brasil. **Quim. Nova**, 2010; 33(10): 2051-2054.

TORRES, M.L.M et al. Uso de pomada de própolis brasileira tipificada e DMSO para tratamento de feridas cirúrgicas. **Braz. J. Nat. Sci.**, 2021; 4(2): e1422021. Disponível em: <https://www.bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/142/119>.

VEIGA, R.S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, 2017; 122(1): 911-920.

WATANABE, M.; FONSECA, C.D.; VATTIMO, M.F.F. Aspectos instrumentais e éticos da pesquisa experimental com modelos animais. **Rev Esc Enferm USP**, 2014; 48(1): 181-8.

WOLCOTT, R.D.; RHOADS, D.D. A study of biofilm-based wound management in subjects with critical limb ischaemia. **Journal of Wound Care**, 2008; 17(4): 145-155.

WOUND, OSTOMY AND CONTINENCE NURSES SOCIETY (WOCN). **Pediatric Ostomy Care: Best Practice for Clinicians**. Mount Laurel: NJ, WOCN Society, 2011.

YAMADA, B.F.A. **Pele – o manto protetor: higiene e hidratação**. São Paulo: Andreoli, 2015.

ZOMER, H.D.; TRENTIN, A.G. Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research. **J Dermatol Sci.**, 2018; 90(1): 3-12.

ANEXOS

ANEXO A – Documento de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de fevereiro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "ESTUDO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO DE PRÓPOLIS NO TRATAMENTO DA DERMATITE DE CONTATO INDUZIDA EM RATOS WISTAR ADULTOS." Protocolo n.º 80/2018, sob responsabilidade da Professora Ivone Kamada foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (27 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 12/11/2018 a 12/03/2019.


Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB





*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.