



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

PARMÊNEDES DIAS DE BRITO

**EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E GEOPRÓPOLIS DE ABELHA
CANUDO (*Scaptotrigona sp.*) E JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E VIABILIDADE DE TRANSPLANTES CUTÂNEOS
ALOGÊNICOS E AUTÓLOGOS**

MOSSORÓ-RN
2020

PARMÊNEDES DIAS DE BRITO

**EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E GEOPRÓPOLIS DE ABELHA
CANUDO (*Scaptotrigona sp.*) E JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E VIABILIDADE DE TRANSPLANTES CUTÂNEOS
ALOGÊNICOS E AUTÓLOGOS**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas

MOSSORÓ-RN
2020

Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

B862e Brito, Parmênedes Dias de.
EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E
GEOPRÓPOLIS DE ABELHA CANUDO (*Scaptotrigona* sp.) E
JANDAÍRA (*Melipona* subnitida) NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E VIABILIDADE DE TRANSPLANTES
CUTÂNEOS ALOGÊNICOS E AUTÓLOGOS / Parmênedes Dias
de Brito. - 2020.
111 f. : il.

Orientador: Carlos Iberê Alves Freitas.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2020.

1. Autoenxerto. 2. Aloenxerto. 3. Granuloma.
4. Abelha sem ferrão. 5. *Apis mellifera*. I.
Freitas, Carlos Iberê Alves, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

PARMÊNEDES DIAS DE BRITO

**EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E GEOPRÓPOLIS DE ABELHA
CANUDO (*Scaptotrigona sp.*) E JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA E VIABILIDADE DE TRANSPLANTES CUTÂNEOS
ALOGÊNICOS E AUTÓLOGOS**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Defendida em: 30/06/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas (UFERSA)
Presidente



Prof. Dr. Wirton Peixoto Costa (UFERSA)



Prof. Dr. Raimundo Alves Barrêto Júnior (UFERSA)



Profª. Dra. Kátia Peres Gramacho (UFERSA)



Profª. Dra. Maria Rociene Abrantes (Faculdade Cisne)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PARMÊNEDES DIAS DE BRITO – Nascido em Catolé do Rocha-PB, no dia 20 de novembro de 1983, filho de Elídio Francisco Dias e Lucimar Alves de Brito Dias. Graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2007. Concluiu curso técnico em Sistema de Informação em 2009. Concluiu mestrado em Ciência Animal pela UFERSA em 2011. Entre 2016 e 2018 fez parte do quadro efetivo de professores do IFRN como professor EBTT no campus Pau dos Ferros-RN. Em março de 2016 foi selecionado pelo Programa de Pós-Graduação, ao nível de Doutorado em Ciência Animal pela UFERSA, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas. Durante esse período, desenvolveu trabalhos sobre os efeitos imunológicos da própolis e geoprópolis na cicatrização e sobre transplantes cutâneos.

Dedicatória,

Ao meu pai e professor Elídio Francisco Dias (*In memoriam*) e minha mãe a senhora Lucimar Alves de Brito Dias por todos os ensinamentos, inspiração e por todo o apoio que puderam me dar ao longo de toda a minha trajetória de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, pois tudo vem d'Ele e tudo irá para Ele. Sem Deus nada pode prosperar. Sem Ele nada consegue perdurar.

Agradeço a minha mãe, Dona Lucimar, por toda a força e perseverança na condução da nossa família. Agradeço pelo carinho, zelo e pelos cuidados sem comparação. Foi o único pilar de sustentação nas horas mais difíceis, e quando não foi o único certamente foi o mais forte de todos. Uma paraibana que se fez de forte até quando não podia mais. Nenhum texto será suficiente para agradecê-la.

Agradeço ao professor Elídio, meu saudoso pai, pela educação e pelos os princípios que eu carrego até hoje como norte. Agradeço por ser minha inspiração para o sucesso, todo ensinamento foi como uma singela semente que germinou, cresceu e dá frutos até hoje.

Agradeço aos meus irmãos (Elídio Jr, Neybniz) e irmãs (Neiliane e Lídia) pelo suporte nas horas difíceis. Pelas boas conversas e até pelas boas divergências. Por causa de vocês, e por vocês, eu sempre concentrei o máximo de força que podia para vencer na vida.

Agradeço a doutora Fernanda Araujo, moreninha, por todo o apoio ao longo desses anos. A você eu devo muito! Devo as muitas e muitas alegrias que vivemos e algumas tristezas. Companheira das horas boas e das horas ruins. E que Deus continue iluminando seu sorriso e os nossos caminhos.

Agradeço ao meu Orientador, prof. Carlos Iberê, por ter acreditado na minha capacidade de conduzir esse difícil trabalho de doutorado e pela enorme paciência. Admito que já desdenhei do termo utilizado por muitos ex-orientados (“Paizão”), mas hoje tenho certeza que a preocupação com os resultados e a paciência na orientação justificam essa alcunha. Agradeço todos os conselhos!

Agradeço ao professor Jael Soares Batista pela a ajuda mesmo no período de pandemia. Ao senhor devo muito também.

Agradeço a Banca Examinadora por prestigiarem, com a presença e as inúmeras contribuições a esse trabalho e esse momento tão importante na minha vida.

Agradeço aos meus Amigos Diogo, Enos, Matheus e Jefferson Bruno que sempre me socorreram quando chamei e até quando não chamava. Devo-lhes muito.

Agradeço ao prof. Marcelo Bezerra por toda a ajuda de infraestrutura complementar que precisei ao longo do experimento. Aproveito para agradecer a professora Michelly Macedo por toda a contribuição dada na esfera da patologia clínica. Muitíssimo obrigado aos dois.

Agradeço a todos os animais que fizeram parte deste trabalho, sem a contribuição destas criaturinhas criadas pelo nosso Criador não teria chegado até aqui. Vou além, sem a contribuição dos animais o ser humano não teria chegado tão longe quanto chegou.

Agradeço a todos que de algum modo me impulsionou nessa jornada árdua. A vocês, o meu muitíssimo obrigado!

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E GEOPRÓPOLIS DE ABELHA CANUDO (*Scaptotrigona sp.*) E JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E VIABILIDADE DE TRANSPLANTES CUTÂNEOS ALOGÊNICOS E AUTÓLOGOS, BRITO, Parmênedes Dias de. **Efeito de extratos de própolis verde e geoprópolis de abelha Canudo (*Scaptotrigona sp.*) e Jandaíra (*Melipona subnitida*) na resposta inflamatória e viabilidade de transplantes cutâneos alogênicos e autólogos**, 2020. 111f. TESE (Doutorado em Ciência Animal, Sanidade Animal) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2020.

RESUMO – A própolis e a geoprópolis são produtos resinosos elaborados a partir de exsudatos, óleos e resinas colhidas de plantas pelas abelhas. Esses produtos são conhecidos por apresentarem efeitos biológicos e são utilizados por populares devido às propriedades medicinais, inclusive no tratamento de feridas. Objetivou-se avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo, *Scaptotrigona sp.*, (EHG-Can) e geoprópolis de abelha jandaíra, *Melipona subnitida*, (EHG-Jan) sobre a inflamação aguda, inflamação crônica por corpo estranho, cicatrização e transplante cutâneo alogênico e autólogo em ratos wistar. Para tanto, foram utilizados 36 ratos adultos saudáveis, de ambos os sexos, distribuídos em cinco grupos: animais tratados com formulação contendo 20% de EHPv; tratados com 20% de EHG-Can; tratados com 20% de EHG-Jan; grupo controle positivo (GC+) com fármaco registrado, e; apenas veículo como controle negativo (GC-). Anteriormente as análises *in vivo*, foi feita uma análise físico-química das para caracterização preliminar dos extratos. A inflamação aguda foi induzida por carragenina a 1% (n = 36), a inflamação crônica foi realizada por corpo estranho (lâmina de vidro) (n = 16) e a cicatrização foi acompanhada a partir de ferida circular de 8 mm de diâmetro (n = 16). Os transplantes (n = 20) foram feitos com a incisão e realocação de dois enxertos cutâneos quadrados (1cm²), um para autoenxerto e outro para aloenxerto, respectivamente. Sobre o teor de flavonoides, amostra do grupo EHG-Jan apresentou a maior quantidade (p<0,05), EHPv quantidade intermediária e a do grupo EHG-Can apresentou a menor. Verificou-se um efeito positivo antiedematoso pronunciado do EHPv, moderado efeito nos grupos EHG-Can e EHG-Jan. Na inflamação crônica, o grupo EHG-Jan destacou-se por acelerar a formação do granuloma. Houve aceleração da cicatrização com reepitelização completa por efeito dos extratos EHPv e EHG-Can em 16 dias. Os extratos aumentaram a proteção das áreas lesionadas e induziram retardo na rejeição (necrose) dos enxertos autólogos. De modo similar, porém menos acentuado ocorreu com os transplantes alogênicos. Provavelmente as diversas classes químicas, com substâncias biologicamente ativas específicas, presentes na geoprópolis foram responsáveis pelo satisfatório desempenho nas análises. Além disso, é provável que o efeito protetor contra infecções oportunistas tenha colaborado com os bons resultados. Os extratos hidroalcoólicos de própolis e geoprópolis apresentaram efeitos positivos sobre os processos inflamatórios e reparo de ferida, assim como promoveram proteção do enxerto e retardo na rejeição.

Palavras-Chave: Autoenxerto, aloenxerto, granuloma, abelha sem ferrão, *Apis mellifera*.

EFFECT OF GREEN PROPOLIS AND GEOPROPOLIS EXTRACTS FROM CANUDO BEE (*Scaptotrigona sp.*) AND JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) ON THE INFLAMMATORY RESPONSE AND FEASIBILITY OF ALLOGENIC AND AUTOLOGOUS CUTANEOUS TRANSPLANTS, BRITO, Parmênedes Dias de. **Effect of green propolis and geopropolis extracts from canudo bee (*Scaptotrigona sp.*) and jandaíra (*Melipona subnitida*) on the inflammatory response and feasibility of allogenic and autologous cutaneous transplants**, 2020. 111f. Doctoral thesis (Doctorate in Animal Science, Animal Health) Postgraduate Program in Animal Science (PPGCA), Federal Rural Semi-Arid University (UFERSA), Mossoró-RN, Brazil. 2020.

ABSTRACT – Propolis and geopropolis are resinous products elaborated starting from exudates, oils and picked resins of plants by the bees. Those products are known for they present biological effects and they are used for popular due to the medicinal properties, besides in the treatment of wounds. The aim of this work was to evaluate the effect of the hydroalcoholic extract of green propolis (HEP), canudo bee geopropolis (*Scaptotrigona sp.*) (HEG-Can) And the geopropolis of bee jandaíra (*Melipona subnitida*) (HEG-Jan) on acute inflammation, chronic inflammation, cicatrization of wounds and autogenic and allogenic skin flaps. 36 healthy adult wistar rats, of both sexes, were distributed in five groups: treated animals with formulation containing 20% of; agreements with 20% of HEG-Can; agreements with 20% of HEG-Jan; group positive control (CG+) with pharmaceutical products registered as a positive control group (CG +); only vehicle as a negative control (CG-). Previously the analyses *in vivo*, was made a physical-chemical analysis for preliminary characterization of the extracts. The acute inflammation was induced by 1% carrageenan, chronic inflammation caused by a foreign body (circular sight glass) and wound healing was accompanied starting from wound circular of 8mm of diameter. Transplants were made with the incision and reallocation of two grafts cutaneous squares (1cm²), first to autograft and second to allograft, respectively. On the flavonoides content, the HEG-Jan group has a large amount (p<0.05), an intermediate amount of HEP and a lower amount of HEG-Can. HEP presented a pronounced effect on the acute inflammation (anti-edematous effect), moderate effect of the HEP-Can and HEG-Jan groups was registered. In chronic inflammation, the group HEG-Jan accelerated the process of formation of the granuloma when compared to the other extracts (HEP and HEP-Can). In healing wounds, there was acceleration of the cicatrization due to effect of the extracts of HEP and HEP-Can in 16 days. The extracts show the protection of the skin graft area and discreet retard in the graft rejection (necrosis) of the autografts. In a similar way, however fewer accentuated it happened with the allografts. The several chemical classes of the geopropolis were probably responsible for the satisfactory acting in the analyses. Possibly the effects are biologically related to the presence of substances specific active. Besides, it is probable that the protecting effect against infections opportunists has collaborated with the satisfactory results. The hydroalcoholic extracts of propolis from geopropolis have positive effects on the inflammatory processes and I repair of wound, as well as they promoted protection of the graft and retard in the graft rejection.

Keywords: Autograft, allograft, granuloma, stingless bee, *Apis mellifera*.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

- Figura 1 – Árvore taxonômica das abelhas fornecedoras de própolis e geoprópolis para estudo imunológico, abelha africanizada (*Apis mellifera* L.), abelha Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) e abelha canudo (*Scaptotrigona* sp.)..... 24
- Figura 2 – Abelha africanizada (*A. mellifera* L.) em diversas atividades típicas para a sobrevivência da colônia..... 25
- Figura 3 – Fóssil e figura esquemática reconstituída do fóssil mais antigo de abelha sem ferrão (*Cretotrigona prisca*) encontrada nas Américas (Nova Jersey - EUA)..... 26
- Figura 4 – Abelha Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke)..... 27
- Figura 5 – Abelha canudo (*Scaptotrigona depillis*) protegendo a entrada da colônia que apresenta projeção cerígena em forma de canudo..... 28
- Figura 6 – Desenho esquemático das etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas..... 37

Capítulo 1

- Figura 1 – Diferenças em milímetros (mm) da região subplantar de ratos Wistar no período de 5 horas após aplicação da Carragenina 1% e tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), com dexametasona (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-)..... 63
- Figura 2 – Média \pm desvio padrão da temperatura superficial das mucosas de ratos Wistar, até o tempo de 5 horas após aplicação da Carragenina 1% e tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), com dexametasona (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-)..... 64
- Figura 3 – Cicatrização de feridas circulares avaliadas por redução da área (cm²) com plotagem em valores médios \pm desvios obtidos de ratos de linhagem Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), medicamento cicatrizante registrado (controle positivo, GC+) e apenas creme base (controle negativo, GC-)..... 65

Figura 4 – Aspecto macroscópico das feridas circulares de ratos wistar tratadas com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-)..... 66

Figura 5 – Fotomicrografia de feridas de ratos Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-), em coloração HE em 10X..... 67

Figura 6 – Apresentação macroscópica dos corpos estranhos conectados aos envoltórios recuperados de ratos Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-) 68

Figura 7 – Fotomicrografias dos granulomas por corpo estranho, não imunogênico, em ratos Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-), em coloração HE em 10X..... 69

Capítulo 2

Figura 1 – Esquema experimental de troca de enxertos em ratos Wistar tratados com extrato hidroalcoólico de própolis e geoprópolis 89

Figura 2 – Média \pm desvio padrão da temperatura superficial das mucosas de ratos wistar submetidos à alotransplante e autotransplante cutâneo e tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-)..... 92

Figura 3 – Aspecto macroscópico dos enxertos cutâneos autogênicos de ratos Wistar tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-)..... 93

Figura 4 – Fotomicrografia de tecidos cutâneos de ratos Wistar autotransplantados e tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-)..... 95

Figura 5 – Aspecto macroscópico dos enxertos cutâneos alogênicos de ratos Wistar tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-)..... 96

Figura 6 – Fotomicrografia dos tecidos cutâneos de ratos Wistar alotransplantados e tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-)..... 98

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 – Diferenciação de própolis e geoprópolis segundo sua composição de exsudatos de plantas, cera, anexos e possibilidade de presença de compostos silicosos, baseado no levantamento de Cunha et al. (2010).....	32
---	----

Capítulo 1

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão dos dados da análise físico-química dos extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can) e geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan)	62
--	----

Capítulo 2

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão dos dados da análise físico-química dos extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can) e geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), média seguida dos respectivos desvios-padrão.....	91
---	----

Tabela 2 – Valores (média \pm desvios) hematológicos de ratos Wistar tratados por via tópica com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial contendo dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).....	99
---	----

Tabela 3 – Valores (média \pm desvios) bioquímicos séricos de ratos Wistar tratados por via tópica com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial contendo dexametasona e ciclosporina (controle positivo - GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo - GC-).....	100
---	-----

LISTA DE GRÁFICOS

Revisão de literatura

Gráfico 1 – Valores médios da composição típica da própolis produzida por abelhas (<i>Apis mellifera</i> Linnaeus).....	29
--	----

LISTA DE PRANCHAS

Revisão de literatura

Prancha 1 – A planta alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) frequentada pelas abelhas (*A. mellifera* L.) e o processo coleta de resina para formação de própolis verde. (A) abelha frequentando, (B) o broto, (C) resina na corbícula, (D) coleta, (E) coleta (F) - Lâmina de própolis verde em formação. 31

LISTA DE ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferase
BHT	Butil-hidroxitolueno
CAPE	Ácido caféico fenetil éster
CE	Estado do Ceará, Brasil
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CsA	Ciclosporina A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalentes de ácido gálico por grama
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EHG-Jan	Etrato hidroalcolico de geoprópolis de abelha jandaíra
EHP-Can	Geoprópolis Abelha canudo
EHPv	Própolis Verde
EQ	Equivalente Quercitina em miligrama
FCs	Fatores de Crescimento
GC-	Grupo controle negativo
GC+	Grupo controle positivo
HE	Hematoxilina e Eosina
IC50	Concentração apropriada para inibir a metade da inibição máxima
IL	Interleucina
LEIAS	Laboratório de Estudos em Imunologia e Animais Silvestres
MAC	Complexo de ataque a membranas
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCV	Volume Corpuscular Médio
MEC	Matriz Extra Celular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NaCl	Cloreto de Sódio
PAF	Fator de ativação plaquetária
PB	Estado da Paraíba, Brasil
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrogenioiônico
PPT	Proteína plasmática total
RN	Estado do Rio Grande do Norte, Brasil
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
≤	Menor igual
≥	Maior igual
®	Marca Registrada
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetros
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
mL	Mililitros
cm ²	Centímetros quadrados
mm	Milímetros
µm	Micrometro
µS	Microsiemens
uL	Microlitro
nm	Nanometro
ppm	Parte por milhão
g/L	Gramas por litro
N	Normalidade (química)
kg-1	Por kilograma (1/kg)
uS/cm	Microsiemens por centímetro
uL/mL	Microlitro por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 ABELHAS PROPOLIZADORAS, PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS.....	24
3.1.1 Abelhas produtoras de própolis e geoprópolis.....	24
3.1.2 Produtos resinosos das abelhas.....	28
3.1.2.1 Própolis.....	28
3.1.2.2 Geoprópolis de abelhas sem ferrão.....	31
3.1.3 Composição química da própolis e geoprópolis.....	32
3.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	33
3.2.1. Inflamação aguda.....	34
3.2.2. Inflamação crônica.....	35
3.3 CICATRIZAÇÃO.....	37
3.4 TRANSPLANTES.....	38
REFERÊNCIAS.....	40
4. CAPÍTULO 1 – Efeito de extratos de própolis verde e geoprópolis de abelha Canudo (<i>Scaptotrigona sp.</i>) e Jandaíra (<i>Melipona subnitida</i>) sobre aspectos patológicos em ratos Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>): inflamação aguda, inflamação crônica e cicatrização.....	52
5. CAPÍTULO 2 – Efeito de extratos de própolis verde e geoprópolis de abelha canudo (<i>Scaptotrigona sp.</i>) e jandaíra (<i>Melipona subnitida</i>) sobre a viabilidade de transplante cutâneo autogênico e alogênico em ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) da linhagem wistar.....	81
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
7. ANEXOS.....	111

1. INTRODUÇÃO

A própolis e a geoprópolis são produtos resinosos produzidos por abelhas e utilizados na estrutura das colmeias para vedação de frestas, calafetação, proteção e higienização do ambiente interno da colônia assim como das próprias abelhas (SAWAYA et al., 2011; BANKOVA et al., 2000). De modo geral, a própolis e a geoprópolis são resinas misturadas com cera e, especialmente na geoprópolis, ocorre adição de barro (KERR, 1987). Esses materiais apresentam ampla variação de cor, odor, sabor e consistência, sendo influenciados pela estação do ano e características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia (FILHO, 1998; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

Os efeitos terapêuticos desses produtos resinosos são relacionados aos seus diversos constituintes biologicamente ativos, como os compostos polifenólicos, sendo os flavonoides e ácidos fenólicos os principais (LUSTOSA et al., 2008; MARCUCCI, 1995; NASCIMENTO et al., 2008; SOUSA, 2007). A correlação existente entre os níveis de compostos fenólicos de extratos de própolis brasileiras e atividade antimicrobiana pode, entre outras coisas, colaborar com a cicatrização (SILVA et al., 2006). Também há relatos a respeito dos efeitos benéficos que são atribuídos ao uso de própolis e seus derivados, como alimento funcional, analgésico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antioxidante, estimulante imunológico e até ação antitumoral (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; PINTO; DO PRADO; DE CARVALHO, 2011). Esses relatos impulsionam pesquisas variadas com a própolis, em contradição, trabalhos com geoprópolis frente a seu potencial farmacológico ainda são escassos, principalmente, pesquisas que envolvem benefícios em aspectos imunológicos relacionados à cicatrização e transplantes.

O transplante é uma terapia verdadeiramente presente na medicina humana e aplicável no tratamento de uma ampla variedade de anormalidades (VALENCIA et al., 2006). Evoluiu primeiramente da experimentação animal no início século XX, quando foi transplantado um coração de um filhote para o pescoço de um cão de grande porte (CARREL; GUTHRIE, 1905). Desde então, existe uma crescente demanda por novos produtos que possam proteger os tecidos com o mínimo de neurotoxicidade e nefrotoxicidade (MENDES; BURDMANN, 2002), bem como, evitar a citotoxicidade que ocorre com o uso de antibióticos (FERREIRA, 2008). Além disso, buscam-se fármacos que promovam a integração doador-receptor com a finalidade de obter maior eficácia do transplante e que promova retardo na destruição de tecidos estranhos ao organismo. Nesse contexto, a própolis surge com indícios de mínima

citotoxicidade, aliado ao poder antioxidante, assim como propriedades antimicrobianas, cicatrizante e imunomoduladora (FISHER et al., 2008). Paralelamente, a geoprópolis vem demonstrando efeitos tão benéficos quanto à própolis e seu potencial sobre enxerto é desconhecido. Diante disso, oportuniza-se elucidar quais efeitos benéficos da própolis e geoprópolis são igualmente observados e viáveis quando utilizados em transplantes cutâneos.

Visando elucidar os efeitos da própolis e da geoprópolis sobre processos correlacionados ao reparo tecidual e transplantes cutâneos, verificar se as diferenças da geoprópolis não representam desvantagem sobre algumas propriedades biológicas quando comparada a própolis, investigar a intensidade de influência da própolis e a geoprópolis sobre a inflamação aguda e crônica, cicatrização, transplante autólogo e alogênico; e apresentar os produtos resinosos de abelhas nativas como possível fonte de fármacos e opção auxiliar no tratamento de enfermidades veterinárias, então, se faz necessário desenvolver um trabalho de múltiplas comparações, por meio de uma abordagem continuada sobre vários aspectos do reparo tecidual.

Portanto, objetivou-se ampliar o conhecimento dos efeitos de extratos hidroalcoólicos de própolis verde de abelha africanizada (*Apis mellifera* Linnaeus), geoprópolis de abelha canudo (*Scaptotrigona* sp.) e geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) em estudo comparativo sobre fenômenos inflamatórios, cicatrização de feridas e a viabilidade de transplantes cutâneos autólogos e alogênicos em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos dos extratos hidroalcoólico de própolis verde de abelha africanizada (*Apis mellífera* Linnaeus), geoprópolis de abelha canudo (*Scaptotrigona* sp.), geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) sobre inflamação aguda, inflamação crônica, a cicatrização de feridas, e a viabilidade e alterações em enxertos cutâneos autólogos e alogênicos de em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar macroscopicamente e microscopicamente a influência do extrato própolis verde e geoprópolis na morfologia e dinâmica celular do tecido cutâneo de ratos wistar submetidos à inflamação aguda e crônica;
- Averiguar a influência do extrato própolis verde e geoprópolis na morfologia e dinâmica celular durante a cicatrização de lesões cutâneas em ratos Wistar;
- Examinar o efeito sobre a dinâmica celular, proteção e integração em tecidos cutâneos transplantados (autólogo e alogênico) causados pela ação dos extratos de própolis verde e geoprópolis em ratos Wistar;
- Realizar comparação dos tratamentos contendo os extratos hidroalcoólicos de própolis verde e geoprópolis com fármacos registrados para estimar o sentido dos efeitos dos extratos.

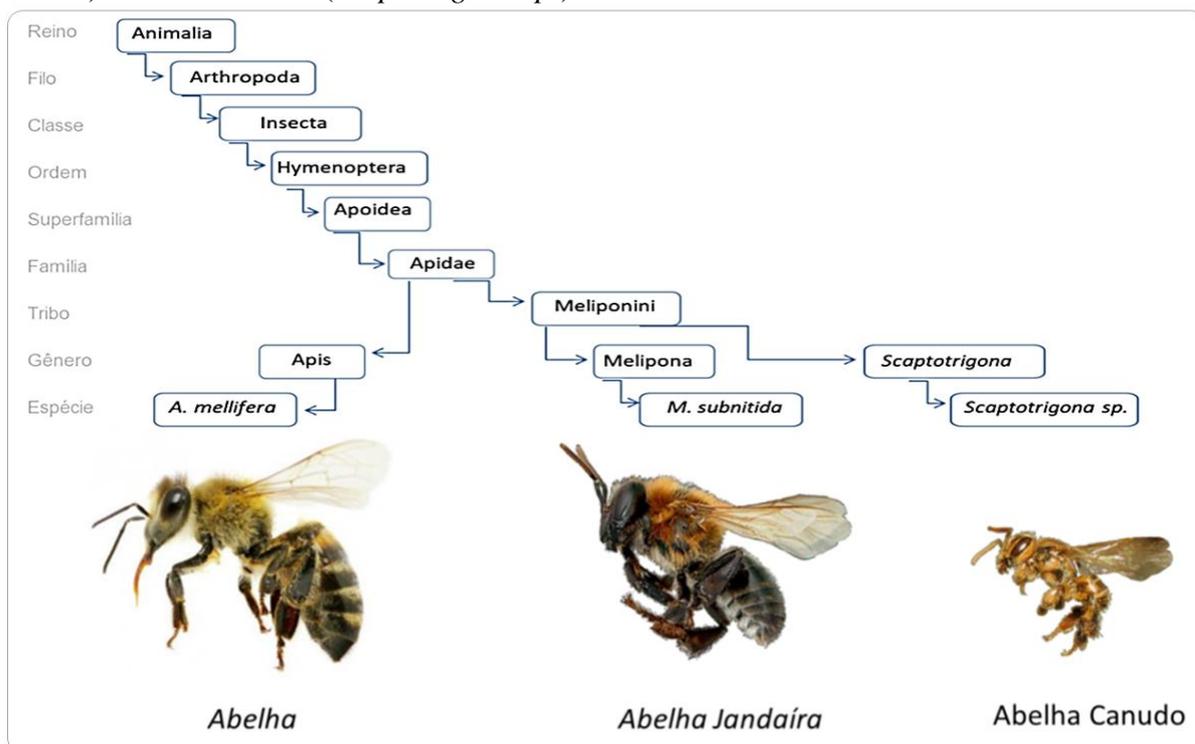
3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ABELHAS PROPOLIZADORAS, PRÓPOLIS E GEOPRÓPOLIS

3.1.1 Abelhas produtoras de própolis e geoprópolis

As abelhas são insetos que pertencem à ordem Hymenoptera, da superfamília Apoidea, subgrupo Anthophila (SILVA et al., 2014) e família Apidae (Figura 1). Sobre as espécies deste trabalho, há uma diferença filogenética maior em relação às abelhas-sem-ferrão, que pertencem à tribo Meliponini (BUENO, 2010). Estes insetos trazem vários benefícios à natureza, principalmente, pelo seu papel natural de polinização de plantas nativas, exóticas e de cultivares de alta relevância para alimentação diária de milhares de pessoas e animais (SANTOS, 2010).

Figura 1 – Árvore taxonômica das abelhas fornecedoras de própolis e geoprópolis para estudo imunológico, abelha africanizada (*Apis mellifera* L.), abelha Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) e abelha canudo (*Scaptotrigona* sp.).



Fontes: Abelha Apis (primeira da esquerda para a direita) <https://www.cpt.com.br/cursos-criacaodeabelhas/artigos/abelhas-funcoes-da-rainha>. Abelha jandaíra (a do meio) <https://docplayer.com.br/68611074-A-abelha-jandaira-no-passado-no-presente-e-no-futuro-vera-lucia-imperatriz-fonseca-dirk-koedam-michael-hrncir.html>. Abelha canudo (a terceira da esquerda para a direita) <https://www.inaturalist.org/taxa/252854-Scaptotrigona>.

Os produtos produzidos por esses insetos, como mel, cera, própolis, geoprópolis, apitoxina e geleia real, podem ser aproveitados pelo homem de maneira econômica, sendo que alguns desses produtos contam com o conhecimento popular de que são produtos naturais que podem ser usados na medicina caseira (MARCUCCI et al., 1996).

As abelhas mais exploradas economicamente no Brasil, com ampla distribuição, são as abelhas africanizadas (DO NASCIMENTO et al., 2008). Esse poli-híbrido nacional (Figura 2) é resultado do cruzamento de raças europeias com a subespécie africana, *A. mellifera scutellata*, e prevaleceu sobre as espécies originais com elevada eficiência (COUTO; COUTO, 2002; GONÇALVES, 1974).

Figura 2 – Abelha africanizada (*A. mellifera* L.) em diversas atividades típicas para a sobrevivência da colônia.



Legenda: (A) Preenchimento dos alvéolos; (B) a rainha com tamanho diferenciado; (C) abelha no alvado fazendo a patrulha; (D) abelha fazendo a coleta de resinas para produção de própolis. Fontes: (A) <http://www.xapuri.info/meio-ambiente/ecologia/os-potes-de-mel-de-onde-vem-nossas-abelhas/> (B) http://revistagalileu.globo.com/revista/common/0,emi2285_21-17770,00-cientistas+descobrem+proteina+que+transforma+abelha+em+rainha.html (C) <http://abelhadebuckfast.blogspot.com.br/p/nossa-abelha-buckfast-apis-mellifera.html> (D) <http://www.g-sat.net/showthread.php?109453-Abelha>.

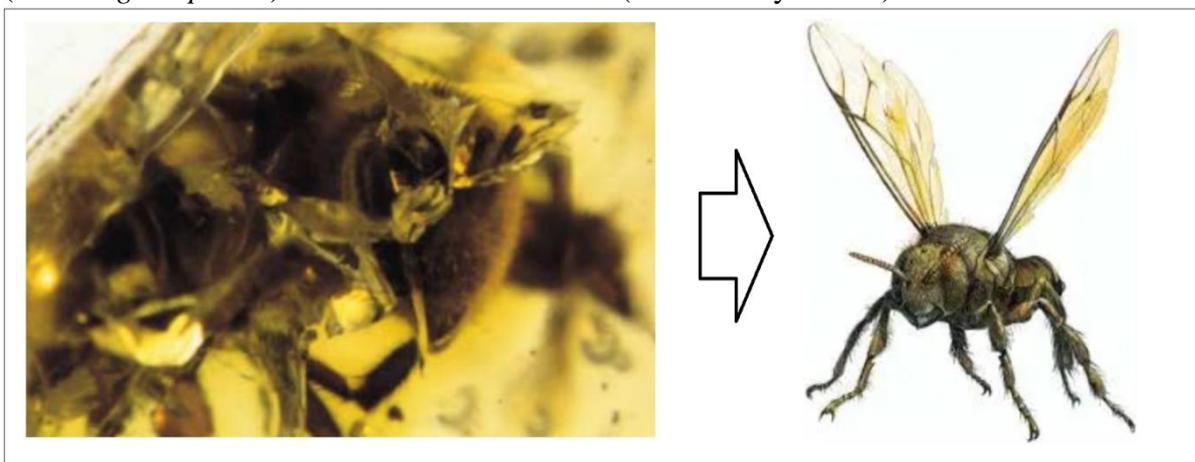
Esta abelha híbrida apresenta elevada rusticidade; capacidade enxameatória, produtiva e defensividade maiores que as observadas nas outras subespécies de *Apis mellifera* (SOUZA, 2006). Dispersou-se rapidamente em todo território brasileiro e ganhou os apiários em todas as regiões nacionais, havendo predominância das características das abelhas

européias na região sul do Brasil e das abelhas africanas no norte do país (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

As abelhas apresentam glândulas mandibulares que produzem enzimas que dissolvem a cera e ajudam na elaboração de geleia real, assim como participam da elaboração da própolis. Outra estrutura importante desse inseto é a corbícula, concavidade (bolsa) que auxilia no transporte de pólen e resinas necessários para elaboração da própolis, presente no último par de membros (MEYER; ULRICH, 1956, SIMONE-FINSTROM; SPIVAK, 2010).

Os meliponíneos, também chamados de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini), compõem um grupo diverso de abelhas abundantemente encontrados em regiões tropicais e subtropicais do planeta e amplamente difundido no Brasil (KERR, 1987; MICHENER, 2007; NOGUEIRA-NETO, 1997). As abelhas sem ferrão são abelhas sociais, mas também podem ser solitárias. Seu processo de polinização apresenta grande importância para a natureza, auxiliando na manutenção da biodiversidade e na produção de alimentos (MAIA et al., 2015). Há aproximadamente 300 espécies de meliponíneos na fauna brasileira (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). Sua existência data do período Cretáceo, a aproximadamente 120 milhões de anos. Segundo Velthuis (1997) essa estimativa decorre da descoberta de fóssil de abelha operária da *Cretotrigona prisca* (previamente chamada de *Trigona prisca*, Figura 3) na América do norte.

Figura 3 – Fóssil e figura esquemática reconstituída do fóssil mais antigo de abelha sem ferrão (*Cretotrigona prisca*) encontrada nas Américas (Nova Jersey - EUA).



Fonte: <https://sweetesthoneybees.wordpress.com/about/>, com modificação.

A abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) é uma abelha sem ferrão (Figura 4), eussocial, nativa do nordeste brasileiro (NOGUEIRA-NETO, 1997). É difundido entre a população do nordeste, principalmente a da zona rural, que o mel e pólen apresentam

propriedades medicinais (KERR, 1987). Também constitui uma fonte alternativa de ganhos para entusiastas (*hobby*) e meliponicultores (VENTURIERI et al., 2003). Apesar de seu potencial econômico e ecológico, é uma espécie que se encontra ameaçada (DA SILVA et al., 2014).

Figura 4 – Abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).



Fonte: <http://ilovenature123.blogspot.com.br/2012/03/abelias-nativas.html>.

A abelha canudo (*Scaptotrigona sp.*) é uma abelha sem ferrão (Figura 5), que apresenta cerca de 4 mm, eussocial e de colônia pouco populosa com aproximadamente 2-4 mil insetos (LINDAUER; KERR, 1960). A produção de mel anual é baixa, no entanto é relativa produtora de pólen (FERREIRA; REBELLO, 2005). Elas são chamadas dessa maneira devido à característica de construir um canudo na entrada da colônia, o que constitui uma barreira física eficiente contra pilhagem e predadores (DE OLIVEIRA LIMA; SILVESTRE; BALESTIERI, 2013).

Figura 5 – Abelha canudo (*Scaptotrigona depilis*) protegendo a entrada da colônia que apresenta projeção cerígena em forma de canudo.



Fonte: (A) <http://www.abelhasdobrasil.com.br/2011/06/as-abelhas-solitarias-semi-sociais-e.html>. (B) <http://www.biofaces.com/post/21220/abelha-canudo/>

3.1.2 Produtos resinosos das abelhas

A elaboração da própolis e da geoprópolis depende de uma matriz de natureza resinosa obtida de plantas. Essas resinas são produzidas naturalmente pelas plantas, quer seja de modo fisiológico, quer seja de modo patológico (SILVA, 2017), este último ocorrendo geralmente como resposta protetiva a injúrias (LAMBERT; POINAR, 2002). Os exsudatos induzidos por injúrias não devem favorecer o crescimento de microrganismos, ao contrário, geralmente apresentam diversos efeitos biológicos, não raro com efeito defensivo contra microrganismos (LIMA, 2006). É igualmente importante destacar que alguns pesquisadores encontraram considerável similaridade entre as resinas das plantas com as respectivas amostras de própolis (SALATINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005).

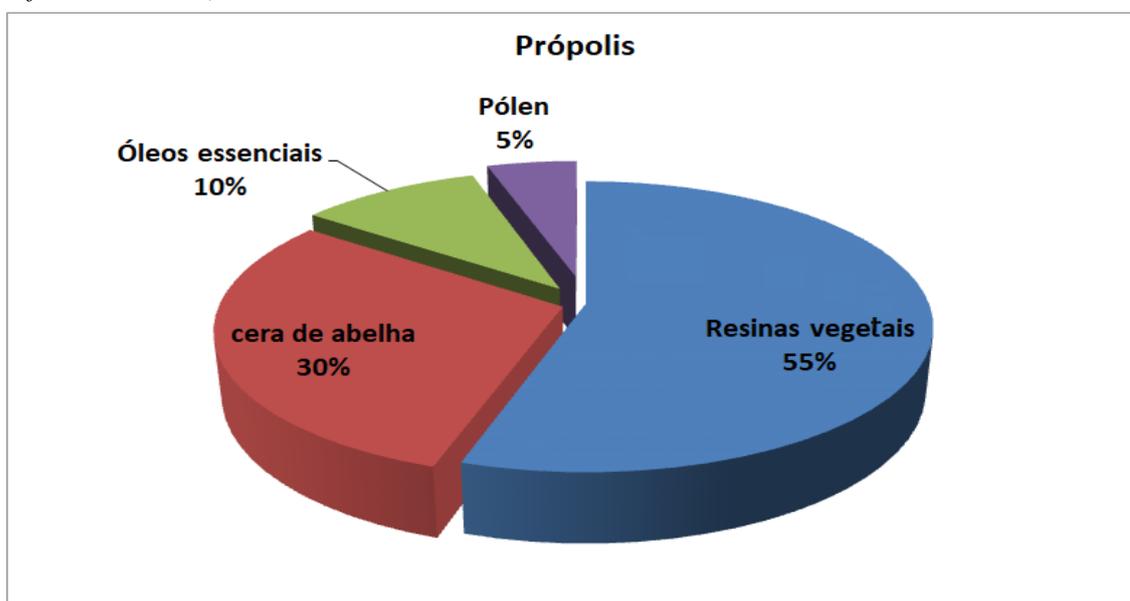
3.1.2.1 Própolis

A própolis é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, ceras e pólen para elaboração final do produto (BRASIL, 2001). A palavra própolis tem origem grega, “pro” que significa “em defesa de” e “polis”, que significa “cidade”. Dessa forma, a própolis tem como finalidade a proteção da colmeia,

vedando frestas e orifícios, servindo como barreira física contra invasores naturais e intempéries. Ela também é utilizada para mumificar cadáveres e revestir os favos, mantendo a assepsia do ambiente da colmeia internamente, assegurando o local de postura dos ovos e reparando favos danificados (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; SAWAYA et al., 2011).

A própolis é um produto que sofre variação de composição e, portanto, também varia características sensoriais como: sabor, cor, odor e consistência. Isso se deve, principalmente, à característica fitogeográfica existente ao redor da colmeia (FILHO, 1998; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004), já que aproximadamente 70% de sua composição são dependentes das plantas. No geral a própolis é constituída por um pool de resinas (Gráfico 1), escolhidos pelas abelhas por afinidade sensorial e pela praticidade na coleta.

Gráfico 1 – Valores médios da composição típica da própolis produzida por abelhas (*Apis mellifera* Linnaeus).



Fonte: Ghisalberti (1979), Thomson (1990) e Banskota et al. (2001).

A própolis é um dos vários produtos obtidos naturalmente e que vem sendo utilizado ao longo dos anos pela humanidade de várias maneiras e finalidades. Já foi utilizada pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios, principalmente para embalsamar os mortos no Antigo Egito (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). E atualmente está sendo bastante usada em tratamentos de diversas afecções, incluindo bucais, na forma de solução extrativa (etanólica), por via oral, ou através de preparações semissólidas (BRUSCHI, 2006),

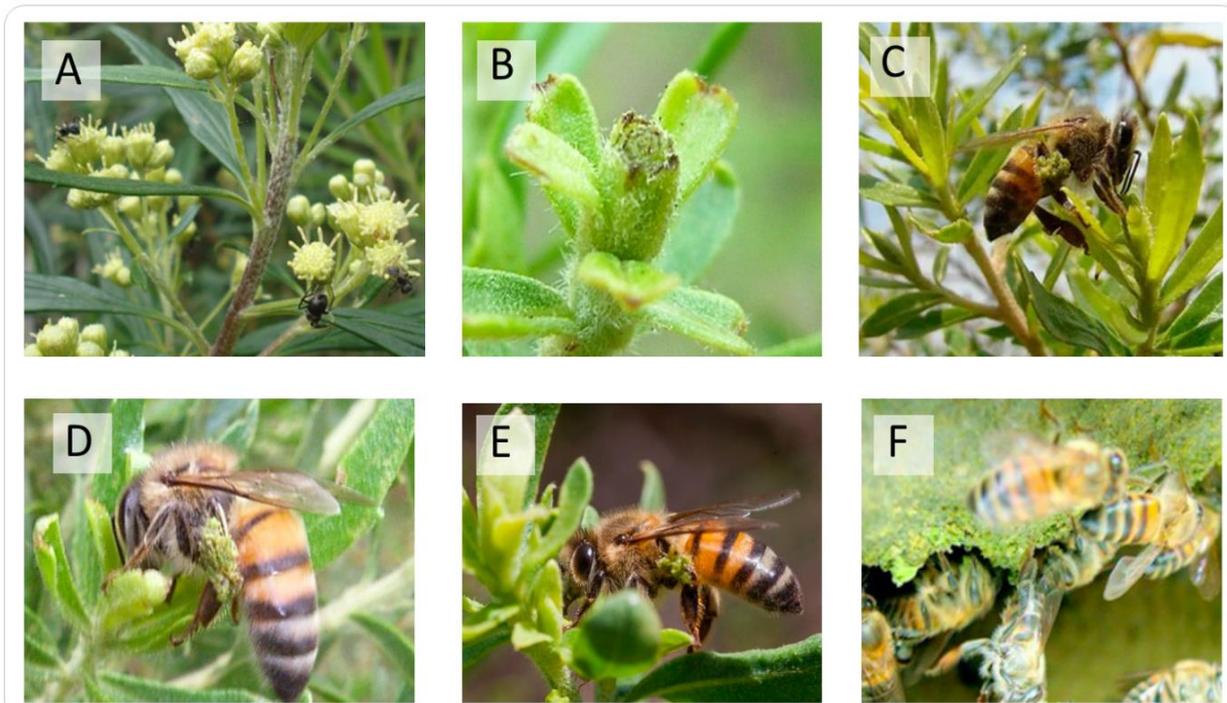
além de ser utilizada de modo auxiliar no tratamento de processos inflamatórios, diabetes, câncer e também problemas cardíacos (LIMA, 2006).

No Brasil existe uma gama muito ampla de plantas que as abelhas usam para obter resinas, extratos e óleos. Por causa dessa ampla biodiversidade é possível obter própolis muito variável tanto nos aspectos organolépticos quanto na composição química. Nesse sentido, foi admitida no Brasil a existência de 12 tipos de própolis (ALENCAR et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005), divididas pela composição química e aspectos sensoriais (BERRETTA et al., 2017; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Há relatos que desde 2007 um novo tipo (13º tipo) de própolis foi possível de ser diferenciada: a própolis vermelha, sendo ela proveniente dos manguezais da Paraíba até a Bahia (BATISTA et al., 2012; DE MENDONÇA et al., 2015). As própolis mais populares são: a verde, a vermelha, a marrom e a amarela.

Especificamente sobre a própolis verde, que é produzida pelas abelhas africanizadas *A. mellifera*, ela tem como espécie vegetal fornecedora da resina a *Baccharis dracunculifolia*, também conhecida popularmente como “alecrim do campo” (Prancha 1), uma espécie nativa do sudeste brasileiro, que é a responsável por lhe conferir sua cor verde (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

É importante ressaltar que a própolis verde possui várias propriedades medicinais já evidenciadas, como ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e imunossupressora (FISHER et al, 2008; MELLO, 2012; CHEUNG et al, 2011; HATTORI et al., 2011, MUTTON et al., 2014). Os flavonoides são os constituintes que mais se destacam nesse contexto, por possuírem efeitos positivos quanto a sua atividade biológica, além de possuir baixa toxicidade (LAPPE, 2004). Além disso, própolis verde possui relevante quantidade de éster fenílico do ácido cafeico (CAPE), que está relacionado à atividade antioxidante e anti-inflamatória, assim como inibidora da lipoxigenase (SUD’INA et al., 1993). E também possui um composto fenólico chamado de Artepillin C (ácido 3-(4-hidroxi-3,5-di (3-metil-2-buten-1-il)fenil)-2-(E)-propenóico) que apresenta considerável atividade apoptótica em células tumorais (KIMOTO et al., 1996; KIMOTO et al., 1998).

Prancha 1 – A planta alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) frequentada pelas abelhas (*A. mellifera* L.) e o processo coleta de resina para formação de própolis verde.



Legenda: (A) abelha frequentando, (B) o broto, (C) resina na corbícula, (D) coleta, (E) coleta (F) - Lâmina de própolis verde em formação. Fontes: Prancha fotográfica modificada de Silveira (2019). Foto (A) <https://senhoranatureza.eco.br/alecrim-do-campo-alecrim-do-cerrado-vassoura-vassourinha-baccharis-dracunculifolia/>. Foto (C) www.greenme.com.br/usuarios/beneficios/4828-alecrim-do-campo-propolis-verde/. Foto (E) https://produto.mercadolivre.com.br/MLB-709775630-alecrim-do-campo-150-sementes-baccharis-dracunculifolia-_JM.

3.1.2.2 Geoprópolis de abelhas sem ferrão

A geoprópolis é um tipo especial de própolis. Esse termo é utilizado para diferenciar a própolis produzida pelas abelhas sem ferrão daquela produzida por outras espécies (BANKOVA; DE CASTRO; MARCUCCI, 2000; PEREIRA; BICALHO; AQUINO NETO, 2003), incluindo abelhas *Apis*, criou-se o termo geoprópolis (BARTH et al., 2013; PINTO; DO PRADO; DE CARVALHO, 2011). A geoprópolis é composta por materiais resinosos e cera, assim como a própolis, no entanto, há também um pequeno percentual de terra ou barro (Tabela 1, CUNHA et al., 2010).

Tabela 1 – Diferenciação de própolis e geoprópolis segundo sua composição de exsudatos de plantas, cera, anexos e possibilidade de presença de compostos silicosos, baseado no levantamento de Cunha et al. (2010).

	Substâncias	Própolis	Geoprópolis
1	Resinas e bálsamos de plantas.	Sim	Sim
2	Cera	Sim	Sim
3	Epiderme e anexos (tricomas)	Sim ¹	Não ²
4	Glândulas	Sim	Não
5	Barro ou areia	Não	Sim

Legenda: ¹(BARTH, 1998; BASTOS et al., 2001.); ²(NOGUEIRA NETO, 1997; BARTH; LUZ, 2003; BARTH, 2006).

A geoprópolis é caracterizada, de modo geral, por fragmentos rígidos, de tamanhos variados e com grânulos de consistência heterogênea. Normalmente apresenta coloração marrom escura, sabor amargo e sem cheiro. O método de preparo dos extratos pode interferir em sua atividade, pois, como ocorre com a própolis, diferentes solventes são capazes de extrair distintos compostos (CUNHA et al., 2004).

3.1.3 Composição química da própolis e geoprópolis

A composição química da própolis é muito complexa, podendo variar na quantidade e até na variedade química. Sobre essa variação, já foram identificados mais de 300 componentes que também variam com a sazonalidade da flora local (CHANG et al., 2009; NUNES et al., 2009). Dentre os componentes destacam-se: flavonoides (galangina, crisina, tectocrisina, pinocembrina, canferol e quercetina), aldeídos aromáticos (vanilina e isovanilina), cumarinas, ácidos fenólicos (ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico), ácidos orgânicos (ácido benzóico), ácidos e ésteres alifáticos e aromáticos, açúcares, álcoois, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, chalconas e diidrochalconas, terpenoides, proteínas, óleos essenciais e outros (BANKOVA; CHRISTOV; MARCUCCI, 1998; FUNARI; FERRO, 2006; MARCUCCI et al., 2001; SALGUEIRO; CASTRO, 2016). É importante frisar que pode ocorrer variação de teores de flavonoides de acordo com a flora visitada, a fitogeografia e fatores climáticos (BANKOVA, 2005; GOMES-CARAVACA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2003), por essa razão há uma falta de padronização e a ocorrência de própolis mais rica em fenóis numa mesma colmeia.

Quando se trata de própolis, a atividade antioxidante dos flavonoides constitui o aspecto mais importante, isso em decorrência da atividade biológica mais diversificada desse tipo de composto, pois existe uma correlação entre o alto conteúdo de flavonoides totais e a atividade antirradical livres em extratos de própolis (AHN et al., 2007). Ainda que Choi et al. (2006) tenham destacado que outros compostos colaborem para a atividade antioxidante da própolis, é importante enfatizar que os flavonoides desempenham um papel mais relevante na atividade antioxidante em extratos de própolis brasileira. Markham et al. (1996) ao analisarem as propriedades antioxidantes de própolis acreditavam ser possível aplicar topicamente para auxiliar o tratamento de pele lesionada.

A composição química da geoprópolis também pode variar muito, dependendo da flora e da região geográfica onde é coletada (ARAÚJO et al., 2015). No geral, a geoprópolis é composta principalmente de carboidratos e seus derivados, compostos fenólicos (benzofenonas, ácidos fenólicos e pinobancsina), ácidos aromáticos, triterpenos, diterpenos, saponinas, açúcares e ácidos graxos, sendo que suas quantidades dependem da florada e da maneira que foi realizada a extração (ABREU, 2011; BANKOVA; CHRISTOV; MARCUCCI, 1998; KUJUMGIEV; TSVETKOVA; SERKEDJIEVA, 1999).

Dutra et al. (2008) ao avaliarem geoprópolis de abelha Tiúba (*Melipona fasciculata* Smith) encontraram o teor de flavonoides variando entre 0,17 - 2,67%, esse percentual, de acordo com a legislação brasileira para classificação de própolis de *A. mellifera*, pode ser considerado como de alto teor de flavonoides (BRASIL, 2001; FUNARI; FERRO, 2006). Os autores ressaltaram a falta de legislação para produtos de outras espécies de abelhas que não sejam *A. mellifera*, o que dificulta definir um padrão de identidade e qualidade para o geoprópolis.

3.2. PROCESSO INFLAMATÓRIO

O processo inflamatório consiste em uma resposta a um trauma e sua cascata de eventos, com múltiplos mediadores, tende a seguir uma via conhecida de manifestação com sintomas variando pouco, ainda que mude o agente lesivo. A inflamação ocorre em tecidos com vascularização, como no tecido conjuntivo vascularizado, no plasma, nos vasos sanguíneos e nos componentes extravasculares do tecido conjuntivo (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996; DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PHILLIPS; MURRY; CROCKER, 1995). Este processo é importante no reparo tecidual, pois sem a inflamação não haveria migração celular, nem configuração de cenário químico para

dar sequência ao reparo, tampouco para criar condições locais adversas aos microrganismos patogênicos. Nesse sentido, o processo se caracteriza por alterações morfofuncionais da microcirculação na área que sofreu a agressão, desse modo, afetando e envolvendo as células, tecidos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos. As alterações tipicamente conhecidas podem ser determinadas pela intensidade ou persistência da injúria, característica do órgão ou tecido atingido e pela capacidade de reação do organismo (PEGORARO, 1994; ABBAS, 2000).

A percepção da ocorrência da inflamação é conhecida desde antiguidade, e o primeiro a estudá-la foi Aulo Cornélio Celso, na Roma antiga, cerca de 50 a.C., caracterizando a inflamação por quatro sinais cardinais “rubor, calor, tumor e dor”. Já no século XIX, o patologista alemão Rudolf Virchow acrescentou um quinto sinal, a perda da função (MONTENEGRO et al., 1999). O processo inflamatório pode se manifestar de uma forma transitória (inflamação aguda) ou de forma persistente (inflamação crônica). Na forma transitória ocorre o predomínio de alterações vasculares exsudativas, já na forma persistente ocorre grande proliferação celular, que não raramente levará a lesão funcional do órgão afetado (GARCIA LEME, 1979; ABBAS, 2000).

3.2.1. Inflamação aguda

A inflamação aguda se inicia instantaneamente após a injúria ao tecido vascularizado. Esse processo se caracteriza por fenômenos celulares e vasculares, tendo como principais mudanças alteração de calibre e fluxo da microcirculação, que resulta em vasodilatação das arteríolas; permeabilidade vascular aumentada das vênulas, em razão do afrouxamento das junções entre as células, acarretando a formação de exsudato rico em proteínas, o que promove o edema; e migração de leucócitos polimorfonucleares, por meio da diapedese, até o local da lesão (ALBERTINE, 2001; MONTENEGRO et al., 1999). Pode-se dizer que o edema inflamatório é a marca registrada da inflamação aguda em razão da vasodilatação (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Esse tipo de inflamação tem sua duração relativamente curta, podendo ocorrer solução em minutos, horas ou até poucos dias, muito embora esteja sujeito a fatores que concorrem para um agravamento ou demora na resolução do processo, como natureza da injúria, intensidade, local e tecido acometido (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2005; RUBIN et al., 2006). O processo é iniciado e mantido por causa de mediadores químicos como: aminas vasoativas (e.g. histamina e serotonina), citocinas (e.g. IL-1, TNF- α), fator de ativação

plaquetária (PAF), radicais superóxidos e derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas) e, também, proteínas plasmáticas (LEME et al., 1973). Há um destaque nas citocinas, por existirem tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias (MASTORAKOS; CHROUSOS; WEBER, 1993), em alguns casos com ambas as ações (IL-6). Entre todas as citocinas, a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são as mais importantes na resposta inflamatória aguda (DINARELLO, 1991).

A respeito do mecanismo de ação, ainda não se sabe o mecanismo exato de como a própolis age sobre a inflamação aguda. Naito et al. (2007), ao estudarem o efeito anti-inflamatório de própolis em edema induzido por carragenina em ratos, afirmaram que uma pomada com própolis foi eficaz em reduzir edema e os autores relacionaram esse efeito a inibição da quimiotaxia de células polimorfonucleares. O que se supõe é que alguns componentes da própolis possam atuar sobre o metabolismo do ácido araquidônico, fundamental para a cascata inflamatória (ROSSI et al., 2002b). Sobre os metabólitos do ácido araquidônico, Mirzoeva; Calder et al. (1996) reconheceram os compostos eicosanoides como os mais importantes sobre a inflamação e, contra a atuação deles elencaram os flavonoides (quercetina e naringerina), assim como ácido cafeico fenetil éster (CAPE) presentes na própolis como os principais agentes anti-inflamatórios. Rossi et al. (2002a) complementam que o CAPE, provavelmente, inibe o metabolismo do ácido araquidônico nos macrófagos, assim como pode, possivelmente, inibir a ativação pelo fator de necrose tumoral e outros agentes anti-inflamatórios, por interferir no fator de transcrição NF-kB, posto que NF-kB regula a expressão de muitos genes envolvidos na inflamação.

3.2.2. Inflamação crônica

O termo crônico (do grego “khrónos”, que significa tempo) é usado quando um processo ou doença perdura por um período temporal longo. No caso da inflamação crônica ocorre a persistência do agente lesivo ou da incapacidade imunológica de repelir a agressão numa cascata de eventos apropriadamente (ABBAS, 2000; RUBIN et al., 2006). A inflamação crônica se caracteriza, também, pela manutenção das alterações inflamatórias por vários dias ou meses após a fase aguda (LIMA, 2018).

Na avaliação histopatológica percebe-se o desvio de neutrófilos (PMN da inflamação aguda) para presença de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos) e também de fenômenos proliferativos (angiogênese e fibrogênese). Nessas circunstâncias

ocorre reparação tecidual simultaneamente ao disparo de nova inflamação aguda, seguida de nova área com necessidade de reparo, por vezes presença de necrose (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2005).

Inflamação crônica por corpo estranho se caracteriza pela presença de um material inabsorvível não imunogênico (vidro, fio de sutura, silicone, etc.) sem a presença de agente infeccioso (DALDON; ARRUDA, 2007). Inicialmente há a presença de neutrófilos que são incapazes de debelar o problema, por consequência, ocorre uma persistência do agente estranho e, em resposta, sucede a ativação de macrófagos para a formação de um granuloma. Esse tipo de granuloma promove acúmulo e fusão das membranas de vários macrófagos, desse modo formando célula multinucleada – macrófago policariote (MARIANO; SPECTOR, 1974; RYAN; SPECTOR, 1970), essa formação ocorre de maneira variável por mecanismo ainda não bem compreendido (MARIANO, 1995; SAKABE, 2007). A ocorrência dessas células epitelióides e gigantes culmina no envolvimento do fragmento (material inabsorvível), contudo, sem a presença considerável dos linfócitos T ou plasmócitos, por ser mínimo o estímulo específico para a resposta humoral. A quase ausência de linfócitos T é comum nesse tipo de granuloma, sendo avaliado como um granuloma mais fraco (ROCHA et al., 2007). Não raro, os estímulos de crescimento (Fator de crescimento de fibroblastos) promovem o desenvolvimento de uma camada de proliferação de fibroblastos que, por sua vez, promove a limitação ou o encarceramento do corpo estranho (GRECA et al., 2004).

Abordando a inflamação crônica sob a perspectiva de influência biológica de materiais resinosos produzidos pelas abelhas, fica evidente a necessidade de mais estudos. Nesse contexto, os poucos estudos existentes sugerem algum efeito da própolis sobre a inflamação crônica. Barnes (1995), ao estudar um tipo de inflamação crônica das vias aéreas (asma), verificou que pacientes submetidos à ação da própolis melhoraram de modo semelhante aos que fizeram uso de glicocorticoides. Ledón et al. (1997), ao estudarem o efeito do extrato de própolis vermelha de Cuba sobre ratos (modelo experimental de psoríase), perceberam que a própolis atuou positivamente, uma vez que apresentou efeito anti-inflamatório no granuloma induzido por corpo estranho não absorvível (fios de algodão). Santos; Vianna; Gamba (2007), ao acompanharem 22 pacientes que estavam acometidos por úlceras crônicas (diabéticas, por pressão e vasculares), observaram que uma pomada elaborada a base de própolis, aplicada diariamente, pode ter sido o único causador da cicatrização das feridas em até 20 semanas (média 13,1). Embora esse tipo de estudo não

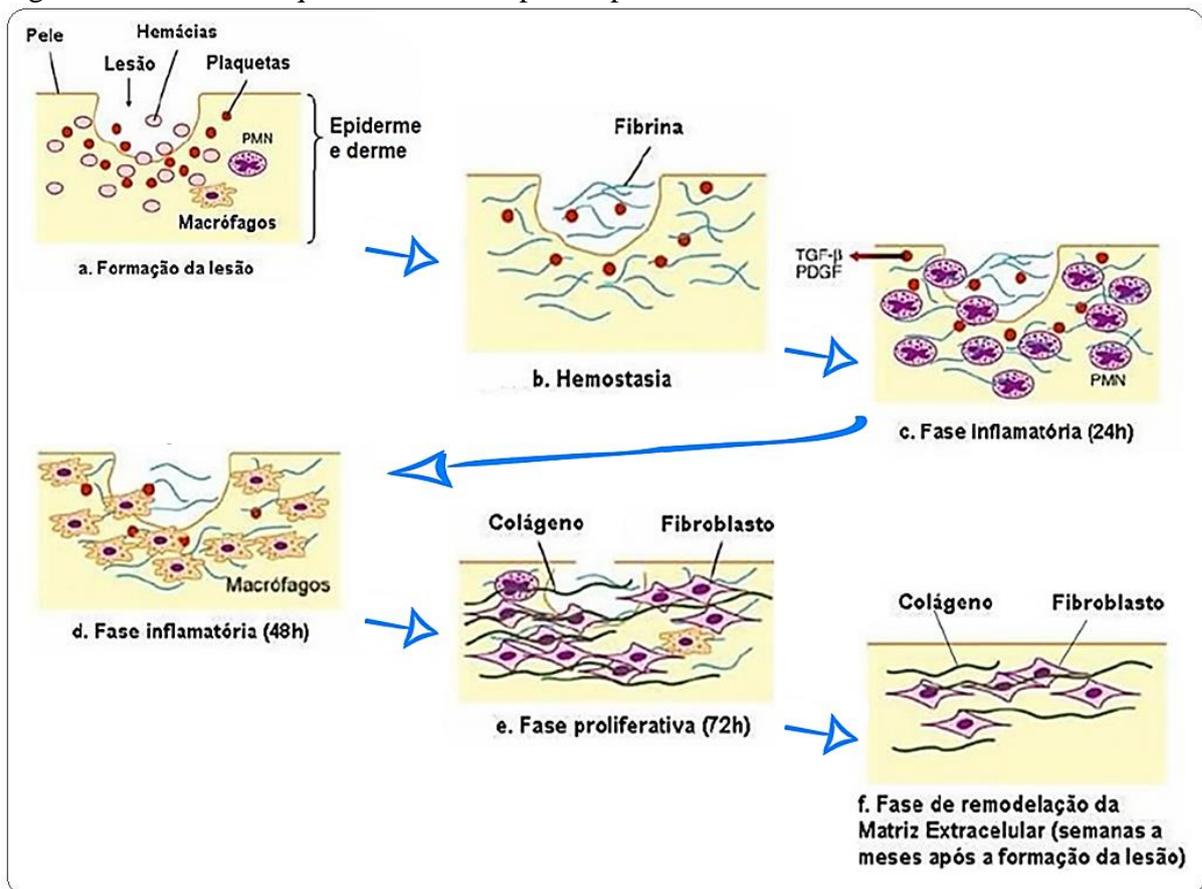
contivesse um grupo placebo, os resultados foram animadores, inclusive pela melhora, destacada pelos autores, no aspecto externo das feridas.

3.3 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização é um processo reparatório de tecidos lesionados, que consiste na capacidade do corpo de substituir células danificadas ou necrosadas após o processo inflamatório inicial, por uma cicatriz não funcional, porém crítica para sobrevivência (CARVALHO, 2002; COTRAN et al., 1994; MEDEIROS et al., 2003).

A cicatrização de tecido tegumentar, em especial, é um processo biológico dinâmico acentuadamente bem orquestrado, cuja lesão resulta na ruptura da integridade tecidual e consequente extravasamento do conteúdo celular e humoral dos vasos sanguíneos. Para melhor entendimento deste processo, a cicatrização foi dividida em fases (Figura 6), a saber: fase inflamatória, fase proliferativa ou de granulação, e de remodelação da matriz extracelular (BRANSKI et al., 2005; SHIMIZU, 2005).

Figura 6 – Desenho esquemático das etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas.



Fonte: Experts Reviews in Molecular Medicine, 2003. Cambridge University Press. (Modificado)

Quando o tecido é lesionado ocorre sangramento imediatamente, devido à lesão vascular local produzida pelo agente agressor. Logo em seguida o organismo lança mão da hemostasia, que se traduz por vasoconstrição e formação de coágulo. Com relação à formação dos coágulos, que consistem em uma cobertura primária composta por fibrina, ela auxilia na aproximação das bordas agredidas e fornece um ambiente para que as plaquetas possam secretar fatores de crescimento (FCs), citocinas, bem como elementos da matriz extracelular (MEC). Por meio destes mediadores do processo inflamatório ocorre o recrutamento primeiramente de neutrófilos e posteriormente dos macrófagos, os quais orquestram as fases seguintes do processo de reparo, quer seja por regeneração ou cicatrização (ISAAC et al., 2010; OLIVEIRA; DIAS, 2012; SANTORO; GAUDINO, 2005).

Há diversos autores que atribuem à própolis efeito cicatrizante (BARBOSA et al., 2009; BERNARDO et al., 1990; PINTO; DO PRADO; DE CARVALHO, 2011) e outros que relacionam esse efeito a sua composição, em especial, aos flavonoides (BANSKOTA et al., 1998; KUJUMGIEV; TSVETKOVA; SERKEDJIEVA, 1999; LUSTOSA et al., 2008; MARCUCCI et al., 2001), posto que eles apresentam capacidade de várias interações biológicas, amplamente estudadas desde as plantas, cujos indícios de interações são relacionados à ativação de macrófagos e indução da atividade fagocítica (BARBOSA et al., 2009; ORSOLIC; BASIC, 2003; SANTOS; VIANNA; GAMB, 2007).

3.4 TRANSPLANTES

O transplante consiste em um minucioso e preciso procedimento cirúrgico de traslado de um órgão, ou parte deste órgão, em plena condição funcional para sanar patologia em outra localidade no mesmo corpo ou em outro organismo (FURLAN; PAIANO, 2008). Para Santos et al. (2015), transplantar também pode ser definido como a transferência de um órgão inteiro, parte deste órgão, ou ainda uma porção de tecido funcional de um indivíduo para outro, ou até mesmo para o próprio organismo para evitar rejeição por incompatibilidade imunológica. Esse procedimento é essencial para pacientes que precisam restabelecer uma função prejudicada pela ineficácia de um órgão ou de um tecido.

Há algumas formas de classificá-los, sendo a relação genética do doador-receptor um dos principais métodos, portanto, são classificados de: Autotransplante (transplante no mesmo indivíduo); Isotransplante (transplante entre indivíduos geneticamente idênticos); Alotransplante (transplante para outro indivíduo da mesma espécie); Xenotransplante

(transplante entre espécies diferentes). Além dessa divisão pode-se classificar segundo suas localizações, como: ortotópico, onde há uma semelhança e proximidade tecidual; ou heterotópico, onde há uma diferença acentuada na fisiologia e distanciamento do local de obtenção da amostra (CASTRO JR; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001; KROHN, 1977).

Os transplantes autólogos apresentam uma grande vantagem por se tratar de transferência de tecido do próprio animal, ou seja, evita-se a destruição do transplante pelo reconhecimento do mesmo complexo de histocompatibilidade (MHC) (MENDES, 2014). De modo contrário, as células dos alotransplantes possuem, frequentemente, MHC diferentes e, por causa disso, facilmente desencadeia uma série de mecanismo de ativação imunológica que resultam em destruição do tecido enxertado (PEREIRA FILHO et al., 2009). Uma vez que as células de defesas são ativadas, pelos imunógenos presentes nos transplantes, ocorre a indução de resposta imune crescente que, se não controlada artificialmente, leva à destruição total dos tecidos transplantados, sendo este processo conhecido como rejeição (LECHLER et al., 1990). É importante citar o papel do sistema complemento que atua formando o complexo de ataque a membranas (membrane attack complex - MAC), pois além de atividade citolítica direta também atrai (quimiotaxia) e estimula as demais células (fagocíticas e citolíticas) (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Quando a rejeição não ocorre, mesmo em animais diferentes, isto é, com a competência imunológica preservada (ausência de imunossupressão inespecífica), esta ocorrência é denominada de tolerância imunológica do transplante (MANFRO; GONÇALVES; SAITOVITCH, 1999). Outra possibilidade que retarda a rejeição consiste na imunossupressão via fármacos imunossupressores, como Tacrolimus e Ciclosporina (CARRAMASCHI et al., 2000), sendo este último um potente inibidor de calcineurina, elemento fundamental para desencadear reconhecimento de antígenos (DEMAIN; SANSHEZ, 2000).

A técnica de transplante em animais é um recurso terapêutico importante, há diversos trabalhos com ratos (PEREIRA et al., 2001), camundongos (SESTERHEIM; SAITOVITCH, 2005), coelho (CURY et al., 2002) e chinchila (SILVA et al., 2006) que corroboram essa importância, todavia sua utilização ainda está limitada pela falta de fármacos que impeça ou retarde a destruição do enxerto. Nesse contexto, a pesquisa de novos fármacos que possam ser isolados de produtos naturais, por exemplo, pode trazer opções de imunossupressão específica, menos tóxica ou até mais duradoura. Há inúmeros relatos de que a própolis pode afetar membranas de bactérias, principalmente as Gram positivas (FERNANDES JR et al.,

2006), que pode afetar membrana de mitocôndrias (BANSKOTA et al., 2001; FROZZA, 2016; PARK et al., 2004) e também o ácido desoxirribonucleico (DNA) de células, incluindo leucócitos (ORSOLIC et al., 2004). Diante disso, o aprofundamento de estudos com própolis e geoprópolis se justifica por causa das diversas substâncias com efeito biológico e já associadas à imunomodulação.

Dentre os fármacos imunossupressores mais utilizados tem-se a ciclosporina (CsA). Ela é um decapeptídeo, originário do fungo *Tolyposcladium inflatum gams*, que apresenta um potente efeito imunossupressor, por causa disso, possibilitou um avanço terapêutico considerável em transplantes (BOREL; KIS, 1991). Sua introdução ocorreu no final da década de 70, mas sua maior utilização ocorreu em 1983 e desde então é utilizado para prevenir rejeição de transplantes sólidos (GARCIA et al., 2004). Um fator a ser considerado na sua utilização são os efeitos adversos em nefropatas, posto que o efeito colateral mais relevante da ciclosporina é a sua nefrotoxicidade, que se manifesta tanto de modo agudo como crônico (MENDES; BURDMANN, 2002), além disso, também existe a possibilidade de neurotoxicidade (GARCIA et al., 2004). Dessa maneira, seu uso deve ser criteriosamente ponderado.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; KUMAR, Vinay; FAUSTO, Nelson. Robbins & Cotran - Patologia. **Elsevier Brasil**, p.55-200, 2005.

ABBAS, Abul K.; JANEWAY, C.A., JR. Immunology: Improving on Nature in the Twenty-First Century. **Cell** 100: p. 129-138, 2000.

ABREU, B. V. B. **Prospecção química de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith. São Luís**, 2011. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

ABU-SEIDA, Ashraf M. Effect of propolis on experimental cutaneous wound healing in dogs. **Veterinary medicine international**, p1-4, 2015.

AHN, Mok-Ryeon et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.

ALBERTINE, R. **Análise do efeito do laser de Baixa Potência (As-Ga-Al) em Inflamação**

Aguda. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2001.

ALENCAR, Severino Matia et al. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ARAUJO, MARIA et al. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. **Journal of Molecular Pathophysiology**, v. 4, n. 1, p. 12-20, 2015.

ARAÚJO, Maria José Abigail. **Geopropolis de *Melipona fasciculata* SMITH: Ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica.** 2013. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2013.

BANKOVA, V., et al. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53.n 5-6: p.402-406. 1998.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, Vassya. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

BANSKOTA, Arjun H. et al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2001.

BANSKOTA, Arjun H. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.

BARNES, Peter J. Molecular mechanisms of antiasthma therapy. **Annals of medicine**, v. 27, n. 5, p. 531-535, 1995.

BARTH, Ortrud Monika et al. Pollen and physicochemical analysis of *Apis* and *Tetragonisca* (Apidae) honey. **Interciencia**, v. 38, n. 4, p. 280-285, 2013.

BARTH, Ortrud Monika. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, v. 41, n. 2, p. 71-85, 2006.

BARTH, Ortrud Monika. Pollen analysis of Brazilian propolis. **Grana**, v. 37, n. 2, p. 97-101, 1998.

BARTH, Ortrud Monika; LUZ, Cynthia Fernandes Pinto Da. Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments. **Grana**, v. 42, n. 2, p. 121-127, 2003.

BATISTA, Lara Livia Valença et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 515-520, 2012.

BERRETTA, Andresa A. et al. Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. Superfood and functional food: an overview of their processing and utilization, **InTechOpen**, Rijeka, Croatia, p. 55-98, 2017.

BOREL, J. F.; KIS, Z. L. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). **Transplant Proc**, v. 23, n. 2, p. 1867-74, 1991.

BRANSKI, Ryan C. et al. Biochemical markers associated with acute vocal fold wound healing: a rabbit model. **Journal of Voice**, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001.

BROOKS, Peter C. Role of integrins in angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 32, n. 14, p. 2423-2429, 1996.

BRUSCHI, Marcos Luciano. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo / USP. Ribeirão Preto, 2006.

BUENO, Jésus Franco. **Sistema automatizado de classificação de abelhas baseado em reconhecimento de padrões**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

CARRAMASCHI, Fábio R. et al. Rat allotransplantation of epigastric microsurgical flaps: a study of rejection and the immunosuppressive effect of cyclosporin A. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 55, n. 1, p. 21-28, 2000.

CARREL A, GUTHRIE C. The transplantation of veins and organs. **American Journal of medicine**. V. 10, p. 2415, 1905.

CARVALHO, Paulo de Tarso Camillo de. **Análise da cicatrização de lesões cutâneas através de espectrofotometria: estudo experimental em ratos diabéticos**. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade

de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

CASTRO JR, Cláudio Galvão de; GREGIANIN, Lauro José; BRUNETTO, Algemir Lunardi. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. **Jornal de Pediatria**, v.77, n.5, p.345-360, 2001.

CHANG R, PILÓ-VELOSO D, MORAIS S.A, NASCIMENTO E.A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Rev Bras Farmacogn* 18: 549-556. 2008.

CHEUNG, K. W. et al. Brazilian green propolis and its constituents, Artepillin C inhibits allogeneic activated human CD4T cells expansion and activation. **Journal of Ethnopharmacology**, n.138, p.463-471, 2011.

CHOI, Y. M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 756-761, 2006.

CONTRAN et al., *Pathologic Basis of Disease*, **WB Saunders**, 6 ed. Philadelphia, p. 39-86. 1994.

COTRAN, Ramzi. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T.; **Robbins Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 045-199, 1996.

COUTO, Regina Helena N.; COUTO, Leomam A.. **Apicultura: manejo e produtos**. 2 ed. FUNEP. Jaboticabal, SP, p.4. 2002.

CUNHA, Ildenize et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, p.964-70, 2004.

CUNHA, Mayara Soares et al. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata Smith* (túba). **Cadernos de Pesquisa**, v. 16, n. 3, 2010.

CURY, Ricardo de Paula Leite et al. Transplante homólogo de menisco: estudo experimental em coelhos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 37, n. 8, p. 341-49, 2002.

DALDON, Patrícia Érica Christofolletti; ARRUDA, Lúcia Helena Fávaro. Granulomas não-infecciosos: sarcoidose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 6, p. 559-571, 2007.

DA SILVA, Geice Ribeiro et al. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2014.

DE MENDONÇA, Izabel Cristina Gomes et al. Brazilian red propolis: phytochemical

screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 357, 2015.

DE OLIVEIRA LIMA, Felipe V.; SILVESTRE, Rogerio; BALESTIERI, José B. P. Nest entrance types of stingless bees (Hymenoptera: Apidae sensu lato) in a Tropical Dry Forest of mid-Western Brazil. **Sociobiology**, v. 60, n. 4, p. 421-428, 2013.

DEMAIN, Arnold L.; SANCHEZ, Sergio. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5-16, 2009.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal Pharm. Pharmac**, v.23, p 297 – 298, 1971.

DINARELLO, Charles A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonist. **Blood**, v. 77, p. 1627-52, 1991.

DO NASCIMENTO, Francisco Jozivan et al. Agressividade de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) associada à hora do dia e a umidade em Mossoró-RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.80-84, 2008.

DUTRA, Richard Pereira et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 557-562, 2008.

FERNANDES JR, Ary et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 294-297, 2006.

FERREIRA, J. B.; REBELLO, J. F. S. Belterra: O paraíso das abelhas indígenas sem ferrão. **Mensagem Doce**, v. 83, n. 23, p. 20-148, 2005.

FERREIRA, Marina Beloti. **Citotoxicidade em relação à concentração e tempo experimental de antibióticos utilizados na terapia endodôntica**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FILHO, R.P. **Criação de Abelhas**. 2 ed. Cuiabá: SEBRAE/MT, p. 85. 1998.

FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 2, p. 247-253, 2008.

FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise de própolis. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

FURLAN, Alessandra C.; PAIANO, Daniela B. Disposição de órgãos para fins de transplante

ou tratamento. **Intertemas**, v. 13, 2008.

GARCIA LEME, J. Métodos experimentais no estudo da resposta inflamatória. **Sociedade Brasileira de Reumatologia**. v. 19, n. 5 , p.146 – 150, 1979.

GARCIA, Solange C. et al. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 393-401, 2004.

GHISALBERTI, Emilio Luciano. Propolis: a review. **Bee world**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GONÇALVES, Lionel S. The Introduction of the African bees (*Apis mellifera adansonii*) into Brazil and some comments on their spread in South America. **American Bee Journal**, v. 11, n.114, p.411-419, 1974.

GRECA, Fernando Hintz et al. Submucosa de intestino delgado no reparo de defeito em parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.5, p.471-477, 2004.

HATTORI, Hideshi et al. Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1 modulating compounds from Brazilian green propolis. **Bioorganic & medicinal Chemistry**, n.19, p.5392-5401, 2011.

HAYACIBARA, Mitsue F. et al. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 110-115, 2005.

ISAAC, C., de Ladeira, P. R. S., DO RÊGO, F. M. P., ALDUNATE, J. C. B., & FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v.89, n.3-4, p.125-131. 2010.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.

KERR, Warwick E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. **Informe Agropecuário**, v. 13, n. 149, p. 15-22, 1987.

KERR, Warwick E. Biologia, manejo e genética de *Melipona compressipes fasciculata* Smith (Hymenoptera: Apidae). Tese Prof. Titular, UFM, São Luiz, MA, p. 14, 1987.

KIMOTO, Tetsuo, et al. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, v. 21, n. 1, p.221, 2001.

KIMOTO, Tetsuo et al. Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy**, v. 23, n.

13, p. 1855, 1996.

KROHN, P. L. Transplantation of the ovary. **The ovary**. Academic Press, 2 ed. New York. p. 101-128. 1977.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.235-40, 1999.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson. **Robbins e Cotran: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 49-89, 2005.

KUMAZAWA, Shigenori; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LAMBERT, Joseph B.; POINAR, George O. Amber: the organic gemstone. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 8, p. 628-636, 2002.

LAPPE, R. **Influência da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

LECHLER, Robert I. et al. The molecular basis of alloreactivity. **Immunology today**, v. 11, p. 83-88, 1990.

LEDON, N. et al. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Zhongguo yao li xue bao*= **Acta pharmacologica Sinica**, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.

LEME, J. Garcia et al. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. **British journal of pharmacology**, v. 48, n. 1, p. 88, 1973.

LIMA, M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, p 120, 2006.

LIMA, Pollyana de Souza Siqueira. **Efeito anti-hiperalgésico do óleo essencial de *Lippia grata* livre e complexado em β -ciclodextrina em modelos animais de dor crônica não inflamatória e dor neuropática**. 2018. Tese (Doutorado Acadêmico em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2018.

LINDAUER, M.; KERR, Warwick E. Communication between the workers of stingless bees.

Bee world, v. 41, n. 2, p. 29-41, 1960.

LUSTOSA, Sarah R. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.

MAIA, Ulysses Madureira et al. Meliponicultura no Rio Grande do Norte. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 4, p. 327-333, 2015.

MANFRO, Roberto C.; GONÇALVES, Luiz Felipe S.; SAITOVITCH, David. Revisão/Atualização em Transplante Renal: Progressos na indução de tolerância em transplantes humanos. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 21, n. 3, p. 130-142, 1999.

MARCUCCI, María C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 1-17, 1995.

MARCUCCI, María Cristina et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.

MARIANO, M. The experimental granuloma: A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 2, p. 161-176, 1995.

MARIANO, M.; SPECTOR, W. G. The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). **The Journal of pathology**, v. 113, n. 1, p. 1-19, 1974.

MARKHAM, K.R.; MITCHEL K.A.; WILKINS A.L. DALDY J.A.; LU Y. HPLC and CG-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p.205-211. 1996.

MASTORAKOS, George; CHROUSOS, George P.; WEBER, Jeffrey S. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 6, p. 1690-1694, 1993.

MEDEIROS, Aldo da Cunha et al. Ação do fator de crescimento de fibroblasto básico na cicatrização da aponeurose abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 5-9, 2003.

MELO, A. A. M. et al. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 44, n. 3, p. 341-348, 2014.

MENDES, Glória Elisa F.; BURDMANN, Emmanuel A. Comparação da nefrotoxicidade experimental de duas formulações de microemulsão de ciclosporina A. **Brazilian Journal of Nephrology.**, v. 24, n. 1, p. 18-25, 2002.

MENDES, Vítor José Nogueira. **Diagnóstico de Rejeição por análise de Potenciais Tardios em doentes Transplantados ao Coração**. 2014. Dissertação (Mestrado em Cardiopneumologia) – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Coimbra, 2014.

MEYER, Waltraud; ULRICH, W. 'Propolis bees' and their activities. **Bee world**, v. 37, n. 2, p. 25-36, 1956.

MICHENER, C.D. The Bees of the World. 2 ed. **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore, p. 953, 2007.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia, Processo gerais. São Paulo: **Atheneu**, ed.6ª, p 22-189 , 1999.

MUTTON, M.J.R. et al. Green and brown propolis: efficient natural biocides for the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation of distilled beverage. **Food Science and Technology**, Campinas, v.34, n.4, p.767-772, 2014.

NASCIMENTO, Evandro A. et al. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 379-386, 2008.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão, São Paulo: **Nogueirapis**, 445-447p. 1997.

NUNES, Lívio C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 524-529, 2009.

OLIVEIRA, Ilanna V. P.M.; DIAS, R. V. C.; Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

PARK, Jae Hyun et al. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 429-436, 2004.

PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M.; AGUIAR, Claudio L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PEGORARO, D. H. **Avaliação do efeito antiinflamatório do extrato Bruto Seco das raízes da *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae)**. 1994. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

PEREIRA FILHO, Gustavo de Azambuja et al. Imunologia do transplante de pele. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 38, n. 01, p. 92, 2009.

PEREIRA, A. dos S.; BICALHO, Beatriz; AQUINO NETO, F. R. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. **Apidologie**, v. 34, n. 3, p. 291-298, 2003.

PEREIRA, Alberto dos S.; SEIXAS, Fernando Rodrigues M. S.; AQUINO NETO, Francisco Radler de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, Celina S. B. et al. Uso de enxerto autógeno de mucosa e osso da concha nasal inferior para a correlação do dorso nasal em rinoplastias: trabalho experimental em ratos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, p. 519-525, 2001.

PINTO, Luciana de Matos A.; DO PRADO, Ney Robson T.; DE CARVALHO, Lucas B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de farmácia**, v. 8, n. 3, p. 25-25, 2011.

ROCHA, Lamara L. V. et al. Efeito da laserterapia sobre modelo experimental de inflamação granulomatosa. **Fisioterapia Brasil**, v.8, p. 335-341, 2007.

ROSSI, Antonietta et al. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. **Fitoterapia**, v. 73, p. 30-37, 2002a.

ROSSI, Antonietta et al. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. **Phytomedicine**, v. 9, n. 6, p. 530-535, 2002b.

RUBIN, Emanuel, et al. Rubin Patologia: bases clinicopatológicas da medicina; 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. 2006.

RYAN, G. B.; SPECTOR, W. G. Macrophage turnover in inflamed connective tissue. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 175, n. 1040, p. 269-292, 1970.

SAKABE, Róberson. **Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho**. 2007. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

SALATINO, Antonio et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.

SANTORO, Massimo M.; GAUDINO, Giovanni. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental cell research**, v. 304, n. 1, p. 274-286, 2005.

SANTOS, Camila M. et al. Percepções de enfermeiros e clientes sobre cuidados de enfermagem no transplante de rim. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 28, n. 4, p. 337-343, 2015.

SANTOS, Marinaldo J.; VIANNA, Lucila do A. C; GAMBÁ, Mônica A. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. 199-204, 2007.

SAWAYA, Alexandra Christine Helena Frankland; DA SILVA CUNHA, Ildenize Barbosa; MARCUCCI, Maria Cristina. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. Campinas-SP. **Chemistry Central Journal**, v.5, n.1, p.1-10, 2011.

SHIMIZU, Tadamichi. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. **Journal of dermatological science**, v. 37, n. 2, p. 65-73, 2005.

SILVA, Dinalva B. et al. Miringoplastia com enxerto livre de membrana de biopolímero de cana de açúcar em *Chinchilla Laniger*. **Anais da Faculdade Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 51, n. 1, p. 45-51, 2006.

SILVA, Geice R. et al. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 299-308, 2014.

SILVA, Jardel B. et al. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. flavocincta* do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 9, p. 874-880, 2016.

SILVA, Jéssica Moreira Batista da. **Prospecção fitoquímica, antioxidante e atividade antibacteriana do extrato da resina exsudada de *albizia lebbbeck***. Monografia de conclusão de curso. Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2017.

SILVEIRA, Fernando A.; MELO, Gabriel AR; ALMEIDA, Eduardo AB. Abelhas brasileiras: sistemática e identificação. Belo Horizonte, **Fundação Araucária**. p. 253, 2002.

SILVEIRA, Marcelo Augusto Duarte. **Efeitos da própolis verde brasileira sobre a proteinúria e função renal em pacientes com doença renal crônica: um estudo clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

SIMONE-FINSTROM, Michael; SPIVAK, Marla. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295-311, 2010.

SODRÉ, Geni da Silva. **Características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) dos estados do Ceará e Piauí.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SOUSA, João P. B. et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

SOUZA, D. C. et al. Apicultura – Manual do Agente de Desenvolvimento Rural. **Brasília: Sebrae**, 2ª edição. p.186, 2006.

SUD'INA, G. F. et al. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. **FEBS letters**, v. 329, n. 1-2, p. 21-24, 1993.

TEIXEIRA, Érica Weinstein et al. Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. **Boletim de Indústria Animal**, v. 60, n. 1, p. 83-106, 2003.

TEIXEIRA, Érica Weinstein et al. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

THOMSON, W. McL. Propolis. **Medical Journal of Australia**, v. 153, n. 11-12, p.654-655 1990.

VALENCIA, Alberto et al. Avaliação da interferência da tolerância oral na rejeição do transplante de coração alogênico avascular na orelha de camundongo. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, n. 1, p. 75-84, 2006.

VELTHUIS, H. H. W. **The biology of the stingless bees.** Utrecht, Department of Ethology, Utrecht University, The Netherlands and Department of Ecology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 33 p. 1997.

VENTURIERI, Giorgio Cristino; RAIOL, Vanessa de Fátima Oliveira; PEREIRA, Charles André Barbosa. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança-PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2003.

4. CAPÍTULO I

EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E GEOPRÓPOLIS DE ABELHA CANUDO (*Scaptotrigona sp.*) e JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) SOBRE ASPECTOS PATOLÓGICOS EM RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*): INFLAMAÇÃO AGUDA, INFLAMAÇÃO CRÔNICA E CICATRIZAÇÃO

EFFECT OF GREEN PROPOLIS AND GEOPROPOLIS FROM CANUDO BEE (*Scaptotrigona sp.*) AND JANDAIRA BEE (*Melipona subnitida*) EXTRACTS ON PATHOLOGICAL ASPECTS IN RATS WISTAR (*Rattus norvegicus*): ACUTE INFLAMMATION, CHRONIC INFLAMMATION AND CICATRIZATION OF WOUNDS

Artigo 1 submetido a um periódico B1

MOSSORÓ-RN, 2020

Effect of green propolis and geopropolis from Canudo bee (*Scaptotrigona sp.*) and Jandaíra bee (*Melipona subnitida*) extracts on pathological aspects in rats Wistar (*Rattus norvegicus*): acute inflammation, chronic inflammation and cicatrization of wounds

*Efeito de extratos de própolis verde e geoprópolis de abelha Canudo (*Scaptotrigona sp.*) e Jandaíra (*Melipona subnitida*) sobre aspectos patológicos em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*): inflamação aguda, inflamação crônica e cicatrização*

Parmênedes Dias de Brito^{I*}, Fernanda A. dos Santos^I, José Gustavo de Lima Almeida^I, João Paulo de Holanda Neto^{II}, Jael Soares Batista^I, Carlos Iberê Alves Freitas^I

^I Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Av. Francisco Mota, 572, Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. * Autor para correspondência: parmenedesdbrito@gmail.com.br.

^{II} Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IFSERTÃO). Rua Aristarco Lopes, 240 - Centro Petrolina, PE 56302-100, Brasil.

ABSTRACT – The objective is to evaluate the effect of hydroalcoholic extract from green propolis and geopropolis on the acute inflammation, chronic inflammation, and cicatrization of wounds of wistar rats. 36 adult rats, of both sexes, were distributed in five groups: hydroalcoholic extract of green propolis (HEP); extract of geopropolis - canudo bee (HEG-Can); extract of geopropolis - jandaíra bee (HEG-Jan), only delivery system as negative control group (GC-); registered drugs obtained from veterinary pharmacies as a positive control group (GC+). Previously, a physico-chemical analysis was carried out for characterization. The acute inflammation was caused by induction of 1% Carrageenan (Sigma), and chronic inflammation is carried out by foreign body (circular sight glass) and circular wounds were produced with circumference of 8 mm (puch). There was a difference ($p < 0.05$) in the total number of flavonoids from HEP, HEG-Can and HEG-Jan groups, respectively: 93.72; 7.84 and 331.65 mg of EAG / 100 ml. HEP exhibited an important anti-edematous effect (3 hour resolution), HEG-Jan had a better effect against chronic inflammation. About healing HEP and HEG-Can show the best results with a complete resolution between 15 and 16 days. These results may be associated with different qualities of flavonoids and phenols in the HEG-Can and HEG-Jan groups. Propolis and geopropolis of stingless bees from Brazil have positive effects against acute, chronic inflammation and testicular repair.

Keywords: tissue repair, Africanized bee, native bees of Brazil, healing wound.

RESUMO – Objetivou-se avaliar o efeito o extrato hidroalcoólico de própolis verde e geoprópolis sobre a inflamação aguda, inflamação crônica e cicatrização de ratos Wistar. Foram utilizados 36 ratos adultos, de ambos os sexos, distribuídos em cinco tratamentos: grupo extrato hidroalcoólico de própolis verde (EHPv); grupo extrato de geoprópolis de

abelha canudo (EHG-Can); e grupo extrato de geoprópolis de abelha jandaíra (EHG-Jan), grupo controle negativo (GC-), sem adição de princípio ativo; grupo controle positivo (GC+), com princípio ativo referência de mercado. Previamente, foi feita uma análise físico-química para caracterização dos extratos. A inflamação aguda foi induzida por Carragenina a 1% (Sigma), a inflamação crônica foi realizada por corpo estranho (lâmina de vidro) e a cicatrização foi acompanhada a partir de ferida circular de 8 mm (punch). As quantidades diferentes ($p < 0,05$) de flavonoides totais entre os grupos EHPv, EHG-Can e EHG-Jan foram respectivamente: 93,72; 7,84 e 331,65 mg EAG/100mL. EHPv exibiu maior efeito antiedematoso (resolução em 3 horas), EHG-Jan apresentou o melhor efeito sobre a inflamação crônica. Sobre a cicatrização, EHPv e EHG-Can apresentaram os melhores resultados com completa resolução entre 15 e 16 dias. Tais resultados podem estar associados às diferenças qualitativas dos flavonoides e fenóis dos grupos EHG-Can e EHG-Jan. A própolis e geoprópolis brasileiras apresentaram efeitos positivos sobre a inflamação aguda, inflamação crônica e reparo tecidual.

Palavras-chave: reparo tecidual, abelha africanizada, abelha indígena, creme cicatrizante.

Introdução

A cicatrização é um mecanismo de reparo tecidual que visa limitar os danos, e restabelecer a função e a integridade dos tecidos lesionados (WITTE; BARBUL, 1997). Este processo depende de uma etapa inicial que é a inflamação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005), contudo, essa etapa não pode perdurar indefinidamente (inflamação crônica), nem pode ser exacerbada e causar muito mais danos que o agente da injúria. Para promover a adequada cicatrização em animais existe o emprego de procedimentos cirúrgicos e uso de fármacos que protegem a ferida, modulam a inflamação e evitam contaminação (LEMBI; ALVIM, 2019; MARINHO, 2018). No entanto, métodos opcionais utilizando produtos naturais, como a própolis e geoprópolis, por exemplo, têm mostrado resultados promissores no tratamento de doenças inflamatórias e auxílio da cicatrização (BARBOSA et al., 2009; BERNARDO et al., 1990; REIS et al., 2000). Nesse âmbito, pesquisadores têm realizado estudos no intuito de saber o potencial máximo desses produtos (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

Própolis e geoprópolis são produtos naturais elaborados pelas abelhas a partir de matriz resinosa de plantas, exsudados vegetais de defesa com capacidade de inibir microrganismos (LAMBERT; POINAR, 2003; SILVA, 2017) e, posteriormente, acrescidos de cera e enzimas próprias, a geoprópolis em especial possui alguma fração terrosa (KERR, 1987). Estes são utilizadas dentro da colmeia para vedação, calafetar resíduos, estruturar

componentes internos, higienização de favos e das próprias abelhas (SAWAYA et al., 2011; BANKOVA et al., 2000). Esses produtos são utilizados por populares como medicamento caseiro e, atualmente, pela indústria devida suas propriedades antimicrobianas (SFORCIN; BANKOVA, 2011).

O acervo de estudo com geoprópolis é ainda mais escasso em comparação com os trabalhos científicos com a própolis, pois este último é mais divulgado em comerciais, pode ser obtido mais facilmente e em maior quantidade. Essa divulgação se deve às várias propriedades que são atribuídas à própolis, como: propriedade analgésica, antiviral, antitumoral, imunomoduladora (FISHER et al., 2008, LUSTOSA et al., 2008), antifúngica, hipotensiva, anti-inflamatória (REIS et al., 2000; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; BARACHO et al., 2009), e cicatrizante (BERNARDO et al., 1990; BARBOSA et al., 2009). Sendo recorrente e convergente a atividade antioxidante, anti-inflamatória e cicatrizante (PINTO et al., 2011) por ação, principalmente, dos flavonoides (BANSKOTA et al., 1998; MARCUCCI et al., 2001; LUSTOSA et al., 2008), e interações sinérgicas em torno dos flavonoides e ácidos fenólicos (FERNANDES JÚNIOR et al., 2006; MENEZES, 2005). Sobre a geoprópolis, à medida que os estudos avançam mais efeitos biológicos são correlacionados, como: atividade antimicrobiana (DA CUNHA et al., 2013), antioxidante (SOUZA et al., 2013), anti-inflamatória (FRANCHIN et al., 2012), antitumoral (FERREIRA et al., 2017) e cicatrizante, muito embora apresentem teores significativamente mais baixos de flavonoides (SILVA et al., 2016).

Tendo em vista aprofundar os estudos sobre os efeitos da própolis e da geoprópolis sobre processos correlacionados ao reparo tecidual; verificar se as diferenças constitutivas da geoprópolis podem apresentar vantagem sobre algumas propriedades biológicas quando comparada a própolis; investigar a intensidade de influência da própolis e a geoprópolis sobre a inflamação aguda, crônica e cicatrização; e apresentar os produtos resinosos de abelhas nativas como possível fonte de fármacos e opção auxiliar no tratamento de enfermidades veterinárias, é necessário desenvolver um trabalho de múltiplas comparações, por meio de uma abordagem continuada sobre vários aspectos do reparo tecidual.

Por isso, objetivou-se analisar os efeitos de extratos hidroalcoólicos de própolis verde de abelha melífera, geoprópolis de abelha canudo (*Scaptotrigona sp.*) e geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) em comparação mútua, inclusive com fármacos registrados, sobre a inflamação aguda, inflamação crônica e a cicatrização de feridas superficial em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar.

Material e Métodos

Local do estudo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Imunologia e Animais Silvestres (LEIAS) e Laboratório de Patologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), campus central, localizada no município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.

Espécie animal

Para a realização deste experimento foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar), adultos, não castrados, hípidos, de ambos os sexos, procedentes do LEIAS/UFERSA. Os animais foram mantidos em manejo de luz escuridão de 12/12h a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, alimentados com ração apropriada para ratos (Linha laboratorial - Presence®) e água *ad libitum*.

Parecer ético e manejo dos animais

O projeto foi elaborado respeitando preceitos éticos de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado no parecer 37/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - CEUA/UFERSA sob número 23091.006656/2019-28.

Obtenção das amostras e elaboração dos extratos hidroalcoólico

A amostra de própolis verde, produzida por abelha africanizada (*Apis mellifera*), foi obtida de Nazaré, Minas Gerais, Brasil. A amostra de geoprópolis de abelha canudo (*Scaptotrigona sp.*) foi obtida na zona rural do município de Aquiraz, Ceará, Brasil. A amostra de geoprópolis de abelha Jandaíra (*Melipona subnitida* DUCKE, 1910) foi obtida de meliponicultores da zona rural do município de São João do Rio do Peixe, Paraíba, Brasil.

O extrato hidroalcoólico de própolis verde (EHPv) foi obtido utilizando-se a técnica de Park et al. (1998), que consistiu na maceração manual dos fragmentos de própolis *in natura* até a obtenção da menor granulação possível, e em seguida foi adicionado ao etanol (83,8 %) na proporção 1:3 [peso/volume]. Posteriormente, a solução foi submetida à agitação diária por 20 dias para melhor extração dos compostos. Depois da obtenção do extrato mãe, o elaborado foi acondicionado sob refrigeração em recipiente de cor âmbar para fotoproteção. Para utilização no experimento, foi procedida a eliminação do solvente para que não interferisse nas análises biológicas.

Para obter o extrato hidroalcoólico de geoprópolis, seguiu-se com técnica realizada por Silva et al. (2016), a saber: 60g do material resinoso foi encaminhado para a secagem em estufa de circulação de ar a 40°C por dois dias. Após, o material desidratado foi triturado em multiprocessador, durante 10 minutos. O pó fino e homogêneo foi pesado e solubilizado em solução de etanol a 70% na proporção de 1:3 [p/v] para elaboração do extrato hidroalcoólico. No intuito de obter a melhor extração possível, a solução foi submetida à agitação diária durante 20 dias. Para reter as impurezas e partículas insolúveis, a mistura foi filtrada com papel filtro. Terminado esse processamento, a solução filtrada também foi armazenada em recipiente protegido da luz em refrigeração.

Análises físico-químicas dos extratos de própolis e geoprópolis

O Potencial hidrogeniônico (pH) das amostras foi medido com o auxílio de pHmetro digital Tecnal modelo Tec-3MP previamente calibrado com solução tampão (pH = 4,0 e 7,0). Para avaliar a condutividade elétrica foram realizadas medidas com auxílio de um condutivímetro Tecnopone modelo mCA 150. Onde o eletrodo do condutivímetro, que já se encontrava estabilizado, pode ser introduzido em um béquer contendo cada extrato diluído numa quantidade de 50 mL de água destilada, realizando-se por fim a leitura em Microsiemens (μS).

Para determinar a atividade antioxidante utilizou-se o método de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), descrito por Velázquez et al. (2003), com adaptações. Por intermédio do reagente antioxidante, a coloração púrpura do DPPH declina, podendo assim ser lida por espectrofotometria devido à mudança de absorbância. Uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição (2-10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) do extrato obtido foi adicionada a 1,5 mL de DPPH (0,029 mg/mL) e depois da agitação, os tubos foram deixados em repouso ao abrigo

da luz por 15 minutos. As leituras de absorvância foram realizadas através do espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G a 517 nm utilizando como controle 1 mL metanol e DPPH. A atividade antioxidante dos extratos foi obtida considerando o percentual de inibição do radical DPPH, calculado conforme equação abaixo:

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle}] \times 100$$

Para medir eficácia de um composto na função bioquímica (biológica) de inibição foi utilizada a concentração apropriada para inibir a metade da inibição máxima (IC50), essa medida liga inversamente o percentual de atividade contra a concentração da substância ensaiada. Sendo assim, foram elaboradas curvas %inibição versus concentração para cada extrato a fim de calcular o valor de IC50. Os parâmetros de regressão linear foram planejados para cada curva em software Origin 7.0.

Os fenóis totais foram determinados conforme a metodologia de Meda et al. (2005), através do uso do reagente Folin-Ciocalteu. A partir dos extratos (20 ppm), retiraram-se alíquotas de 0,5 mL, adicionou-se 2,5mL do reagente Folin-Ciocalteu (0,2N) em tubo de ensaio, após 5 minutos, colocou-se 2 mL de carbonato de sódio (75 g/L) e em seguida mantido em repouso por 2 h ao abrigo da luz. A absorvância foi medida em espectrofotometria Gehaka modelo UV-340G a 760nm, utilizando branco metanol. Os resultados obtidos foram extrapolados em curva de calibração obtida com padrão ácido gálico (20 a 200 ppm), e expressos em mg equivalente ácido gálico (EAG)/100mL de extrato.

Para a determinação dos flavonoides totais seguiu-se metodologia descrita na literatura (MEDA et al., 2005), com adaptações. Alíquota de 5,0 mL do extrato (20 ppm) foi misturada com 5 mL de cloreto de alumínio (2%), em tubo de ensaio. Após 10 minutos, a absorvância foi lida com no espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G em comprimento de onda de 415 nm, utilizando como branco a amostra com metanol sem AlCl₃ para cada amostra. Uma curva de quercetina (5 a 50 mg/L) foi usada como padrão. O conteúdo de flavonoides foi expresso em mg de equivalente quercetina (EQ)/100mL de extrato.

Composição do creme experimental

Com a finalidade de aplicar os extratos de modo prático, simular condições de uso normal de mercado e elevar estabilidade, assim como promover absorção intradérmica, foi

utilizado o creme base Lanette. Esta base dermatológica foi composta principalmente por álcool cetosteárico e cetosteáril sulfato de sódio, butil-hidroxitolueno (BHT) e hidroxibenzoato de propil (Nipazol). O creme final foi obtido com a adição de 20% dos extratos de própolis e geoprópolis (SILVA et al., 2016), seguido de homogeneização.

Desenho experimental

Para o experimento inflamação aguda foram utilizados 36 animais divididos aleatoriamente entre cinco (5) tratamentos, a saber:

- Grupo tratado com extrato de própolis verde de abelha melífera africanizada (EHPv, n = 7);
- Grupo tratado com extrato geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can, n = 7);
- Grupo tratado com extrato de geoprópolis de abelha jandaíra (EHG-Jan, n = 7);
- Grupo tratado com dexametasona (1mg/kg) segundo Madjarof (2009) – controle positivo (GC+, n = 7);
- Grupo tratado apenas com solução salina 0,9% - controle negativo (GC-, n = 8).

Já para o experimento de inflamação crônica e cicatrização foram utilizados 16 animais divididos aleatoriamente entre os cinco tratamentos já citados, com modificações: o grupo CG+ foi tratado com formulação comercial composta por Dexametasona, Neomicina, Bacitracina, Griseofulvina, Benzocaína (Crema 6ª ®, Labayes) e o GC- com o creme base (Lanette®) sem adição de princípio ativo. Os grupos EHPv, EHG-Can, EHG-Jan e GC+ foram compostos por 3 animais, cada. O grupo GC- foi constituído de quatro animais.

Efeito sobre a inflamação aguda

Os efeitos dos extratos de própolis e geoprópolis sobre o processo de inflamação aguda foram estudados por meio da técnica edema de pata, realizado com a aplicação de um indutor inflamatório detectável pelo edema (Carragenina a 1% tipo Lambda, SIGMA®) na região subplatar do membro posterior direito dos animais (BATISTA et al., 2016). Imediatamente após foram aplicados os respectivos tratamentos sobre a área afetada. O acompanhamento foi realizado pela inspeção visual, mensurações da edemaciação e registro

da temperatura por meio de termômetro infravermelho (MINIPA MT-350). A temperatura foi aferida em mucosas expostas, pele glabra e conduto auditivo externo. As mensurações da intensidade da edemaciação foram feitas com auxílio de um paquímetro (feito em duplicata), nos tempos 0 e 1, 2, 3, 4 e 5 horas após aplicação.

Procedimento anestésico utilizado

Para a realização do implante de corpo estranho subcutâneo (inflamação crônica) e da ferida circular (cicatrização) os animais foram submetidos a uma anestesia dissociativa utilizando cloridrato de xilazina (10mg kg⁻¹) e cloridrato de cetamina (75 mg kg⁻¹) (SALAZAR et al., 2011), por meio da aplicação intraperitoneal. Após a constatação do plano anestésico pretendido, iniciou-se a tricotomia e antissepsia do local cirúrgico com iodopovidona a 10%. Imediatamente após a antissepsia foram iniciados os procedimentos.

Estudo de inflamação crônica

Para determinar a influências dos extratos na inflamação crônica foi procedido cirurgicamente o implante de uma lâmina de vidro arredondada de oito (8) mm de diâmetro no tecido subcutâneo da região dorsal do tórax dos animais, conforme descrito por Manrique (2012), com adaptações. Antes do procedimento, as lâminas foram esterilizadas em autoclave e mantidas de modo estéril até o momento da embebição em extrato (secada por 15 minutos em fluxo laminar). A lâmina impregnada foi inserida através de uma incisão (1 cm) transversal no dorso cervical do animal após divulsão do tecido subcutâneo. A síntese cirúrgica foi realizada com ponto simples utilizando mononylon 4.0. As feridas foram tratadas com cremes contendo os respectivos tratamentos por 35 dias. Após esse período, foi realizada a extração do corpo estranho, assim como o tecido em volta (MIRANDA, 2018). Imediatamente após o resgate do disco, as bordas foram posicionadas seguidas por sutura simples (mononylon 4.0). O acompanhamento do processo de inflamação crônica ocorreu por meio de inspeção, com registro dos achados, aferição de temperatura e exame histopatológico da formação granular.

Efeito sobre a cicatrização

Foram produzidas feridas cutâneas utilizando-se *punch* dermatológico de oito (8) mm de diâmetro. A lesão circular foi produzida na região dorsal do tórax em razão da maior dificuldade do animal lambar, morder ou arranhar-se. Após a cirurgia, as feridas foram tratadas conforme seu respectivo tratamento. As aplicações foram realizadas no período matutino com o auxílio de espátulas esterilizadas uma vez ao dia, durante 18 dias. O acompanhamento do processo de cicatrização ocorreu por meio de inspeção, registro de temperatura e fotográfico utilizando um gabarito métrico para mensuração dos diâmetros das cicatrizes e exame histopatológico da borda das feridas.

Para realização das mensurações foram utilizados os seguintes softwares: Picture Manager (Microsoft office®) para rotação e corte de imagens, e o AUTOCAD 2020 para as mensurações lineares e de área.

Histopatológico

As avaliações histopatológicas foram realizadas a partir da coleta de tecido cutâneo oriundos das biópsias (cicatrização) e do granuloma (inflamação crônica). Os tecidos foram fixados em solução formolizada 10% por 48 h, posteriormente desidratados em álcool e diafanizados em xilol, submetidos à inclusão em parafina, cortados a 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE).

As análises foram realizadas por avaliador único utilizando microscópio Nikon® Eclipse E200. Foram analisados os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório de fase aguda e crônica, necrose isquêmica, reação gigantoceular, proliferação fibroblástica, colagenização, reepitelização e neoformação capilar (GONÇALVES FILHO et al., 2006).

Análise estatística dos dados

Os dados de contagem e mensurações foram organizados em planilha eletrônica (Excel), posteriormente, foram submetidos à estatística descritiva em média, desvio-padrão e porcentagem. Em seguida, procedeu-se a análise de pressupostos para verificação de normalidade e homocedasticidade. Constatada a distribuição não paramétrica dos dados, procedeu-se a aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc*

Dunn 5%. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). O software estatístico utilizado foi o BioEstat v.5.0.

Resultados

Os animais apresentaram boas condições pré e pós-cirúrgicas e todos se recuperaram espontaneamente da anestesia. A evolução pós-operatória ocorreu sem registro de intercorrências, com a exceção de um animal do grupo GC- que foi retirado do experimento de cicatrização por risco de septicemia, posteriormente foi devidamente tratado até a completa recuperação.

Em relação à análise físico-química da própolis e geoprópolis utilizadas (Tabela 1), as amostras apresentaram-se ligeiramente ácidas (4,38 a 5,93), sendo a do grupo EHG-Jan a mais ácida entre elas (pH 4,4). Já em relação à condutividade elétrica, os valores encontrados ficaram entre 40,25 a 60,48 uS/cm. A amostra de EHG-Jan foi a que apresentou maior ($p < 0,05$) quantidade de compostos fenólicos, sendo o mesmo observado para o teor de flavonoides totais. No entanto, a maior atividade antioxidante foi observada no grupo EHG-Can ($p < 0,05$), cuja amostra é composta de geoprópolis obtida da abelha canudo (*Scaptotrigona* sp.).

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão dos dados da análise físico-química dos extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can) e geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan).

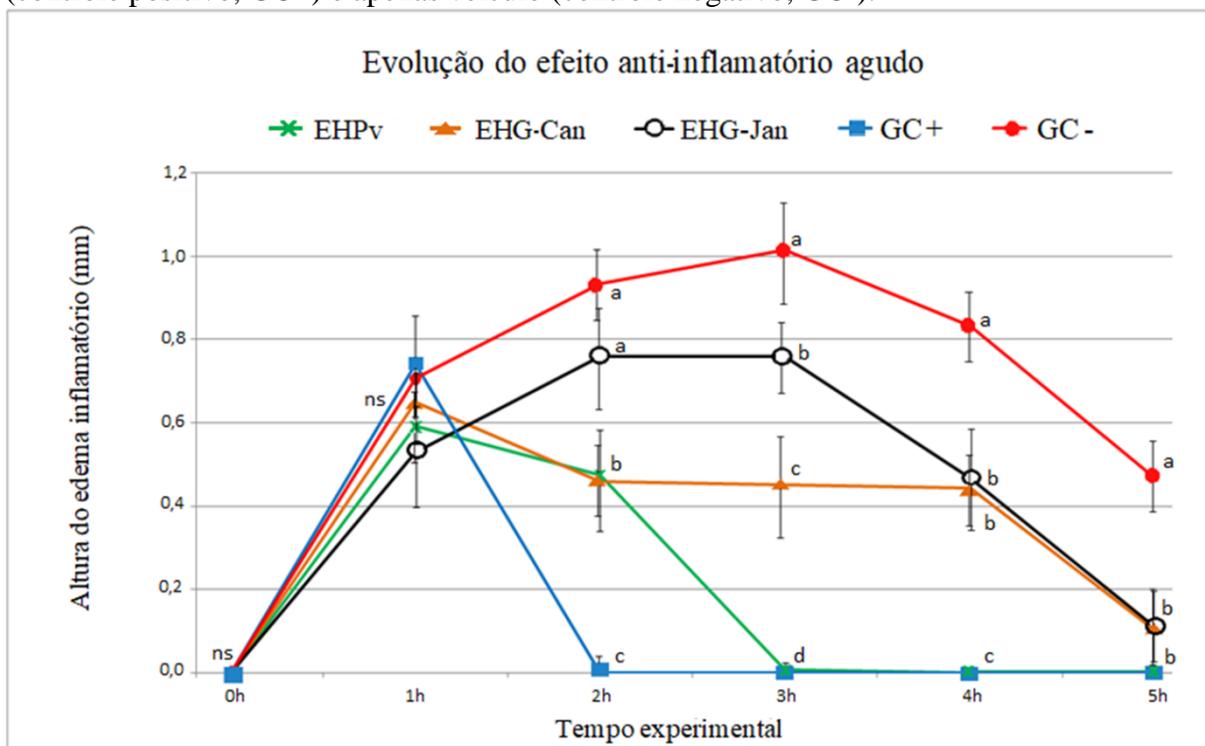
Análises	Unidade	EHPv	EHG-Can	EHG-Jan
Potencial hidrogênio iônico	- *	5,91 \pm 0,02 ^a	5,6 \pm 0,01 ^a	4,4 \pm 0,02 ^a
Condutividade Elétrica	(uS/cm)	49,20 \pm 0,01 ^a	60,45 \pm 0,03 ^a	40,26 \pm 0,01 ^a
Fenóis Totais	mg EAG/100mL	401,93 \pm 3,3 ^{ab}	291,77 \pm 0,74 ^b	992,55 \pm 5,52 ^a
Flavonoides Totais	mg EAG/100mL	93,72 \pm 0,27 ^b	7,84 \pm 0,27 ^c	331,65 \pm 0,54 ^a
Atividade Antioxidante	IC50 uL/mL	25,70 \pm 0,1 ^b	42,32 \pm 1,3 ^a	16,63 \pm 0,05 ^c

Legenda: ^{abc} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). * Adimensional

Na atividade antiedematosa (Figura 1) percebe-se que até a primeira hora não houve diferença entre os grupos, contudo, na segunda hora verificou-se exacerbação do processo inflamatório no grupo GC-, com pico observado na terceira hora. Todavia, o grupo GC+

mostrou intenso e significativo ($p < 0,05$) poder de reversão do edema inflamatório a partir da segunda hora. Na terceira hora, a geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan) não apresentou poder anti-inflamatório suficiente para diferenciar-se do controle negativo, enquanto a geoprópolis de canudo (EHG-Can) e a própolis verde (EHPv) apresentaram uma capacidade intermediária na atividade anti-edematosa. A partir da terceira hora foi possível perceber um considerável efeito do EHPv sobre o edema quando comparado a EHG-Can e EHG-Jan, sendo que estes últimos grupos se consolidaram o efeito intermediário sobre o edema até a quarta hora de avaliação.

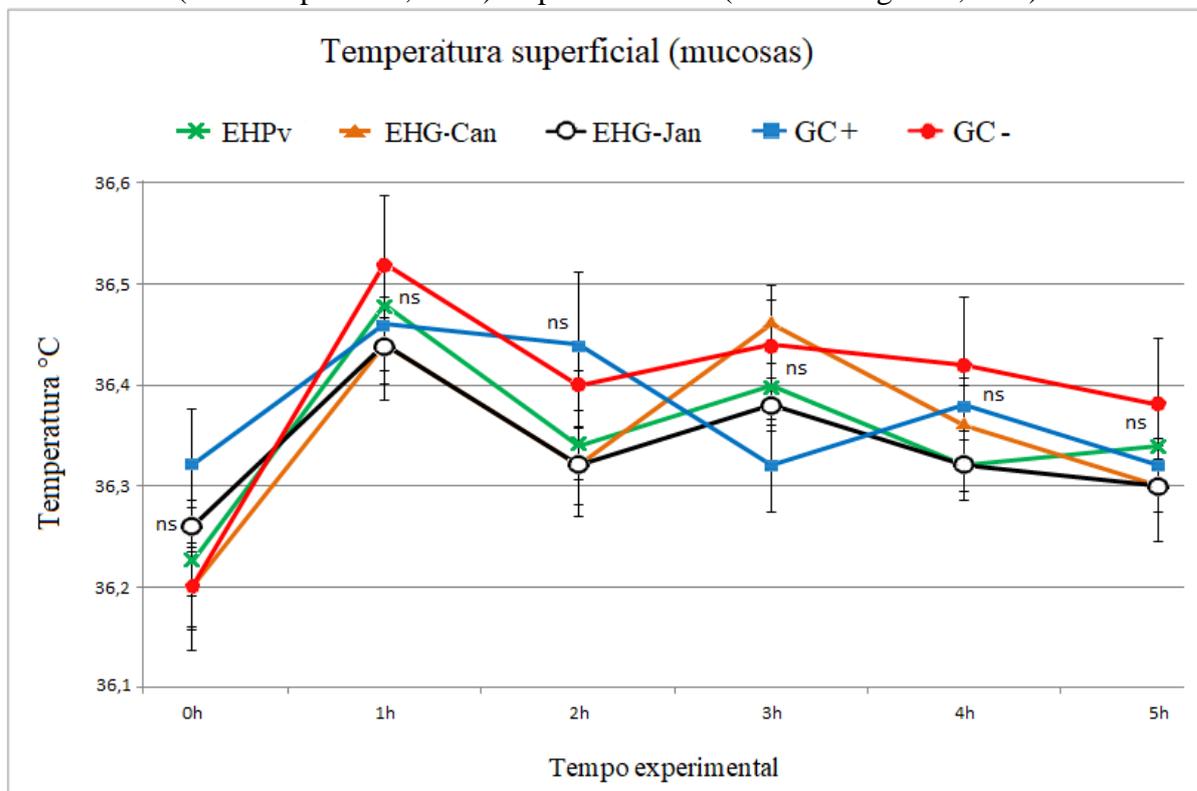
Figura 1 – Diferenças em milímetros (mm) da região subplantar de ratos Wistar no período de 5 horas após aplicação da Carragenina 1% e tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), com dexametasona (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-).



Legenda: ^{abc} Letras diferentes alinhadas verticalmente na mesma hora indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
^{ns} Não significativo entre todos os grupos.

Analisando a temperatura superficial das mucosas dos animais (Figura 2) observou-se que a temperatura de cada tratamento apresentou elevado coeficiente de variação, refletido nos elevados desvios. Não foi observada diferença para esse parâmetro em nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$).

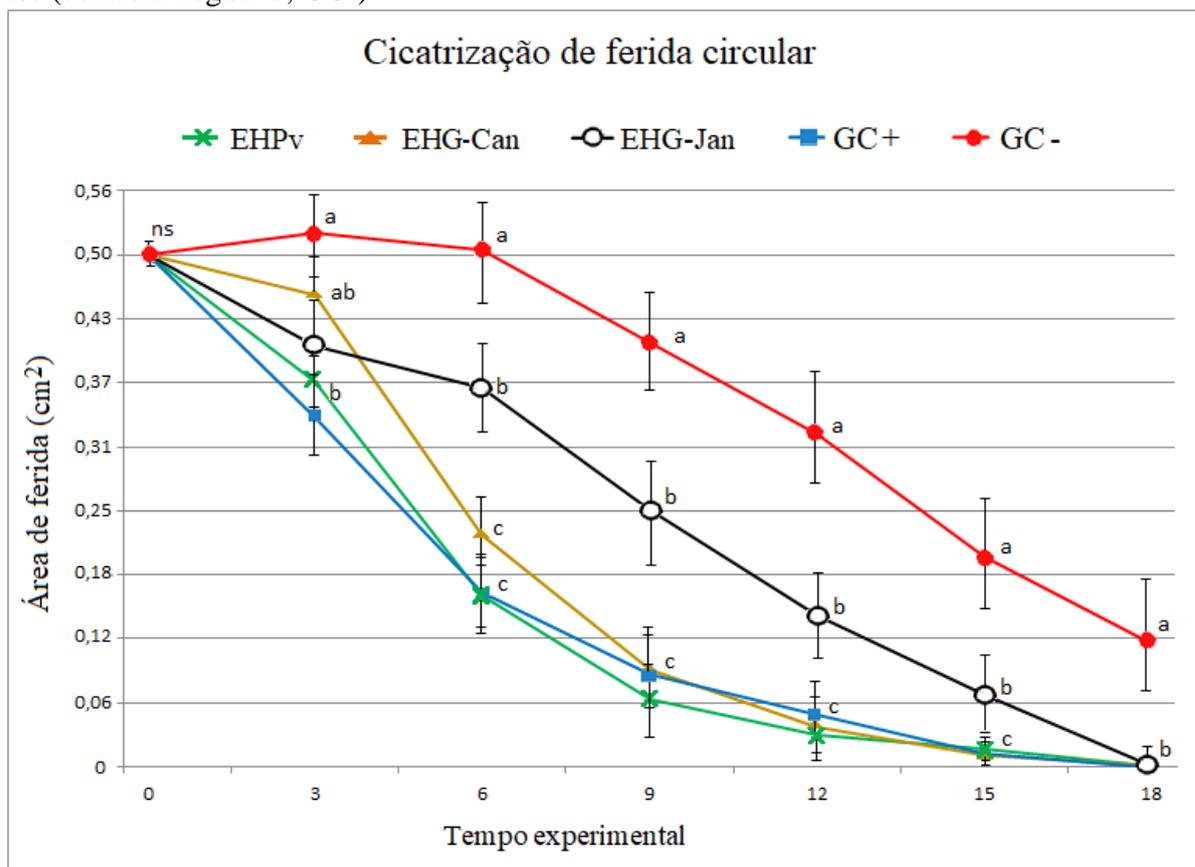
Figura 2 – Média \pm desvio padrão da temperatura superficial das mucosas de ratos Wistar, até o tempo de 5 horas após aplicação da Carragenina 1% e tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), com dexametasona (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-).



Em relação aos dados de área das feridas (Figura 3) verificou-se que houve um aumento da área da ferida em todos os grupos no primeiro e segundo dia ($\sim 0,02 \text{ cm}^2$). Após esse período, as feridas do grupo GC+ apresentaram gradual e constante redução de sua área, podendo ser observada completa reepitelização visível no décimo quinto dia em alguns animais. No grupo GC- as feridas se mantiveram com área maior que o inicial até o 6º dia, havendo dificuldade para reduzir e completar a cicatrização, apresentando assim o pior desempenho ($p < 0,05$) dos tratamentos analisados até o final do experimento. Em relação aos grupos GC+, EHPv e EHG-Can, não foi observada diferença ($p > 0,05$) ao longo de todo o período experimental, adicionalmente, pelo menos um animal de cada grupo apresentou redução máxima da área de ferida até o 15º dia de experimento. As feridas do grupo EHG-Jan apresentaram desempenho semelhante ($p > 0,05$) ao do grupo GC+ até o terceiro dia de análise e, posteriormente, diferiu ($p < 0,05$) até o décimo quinto dia experimental, e após esse período

apresentou-se semelhante aos demais grupos (GC+, EHPv, EHG-Can). Pela demonstração gráfica é possível notar que o grupo EHG-Jan descreveu um comportamento intermediário ($p < 0,05$) na maior parte de período experimental (6^o-15^o dia), porém com boa resolução quando comparado às medidas do controle negativo.

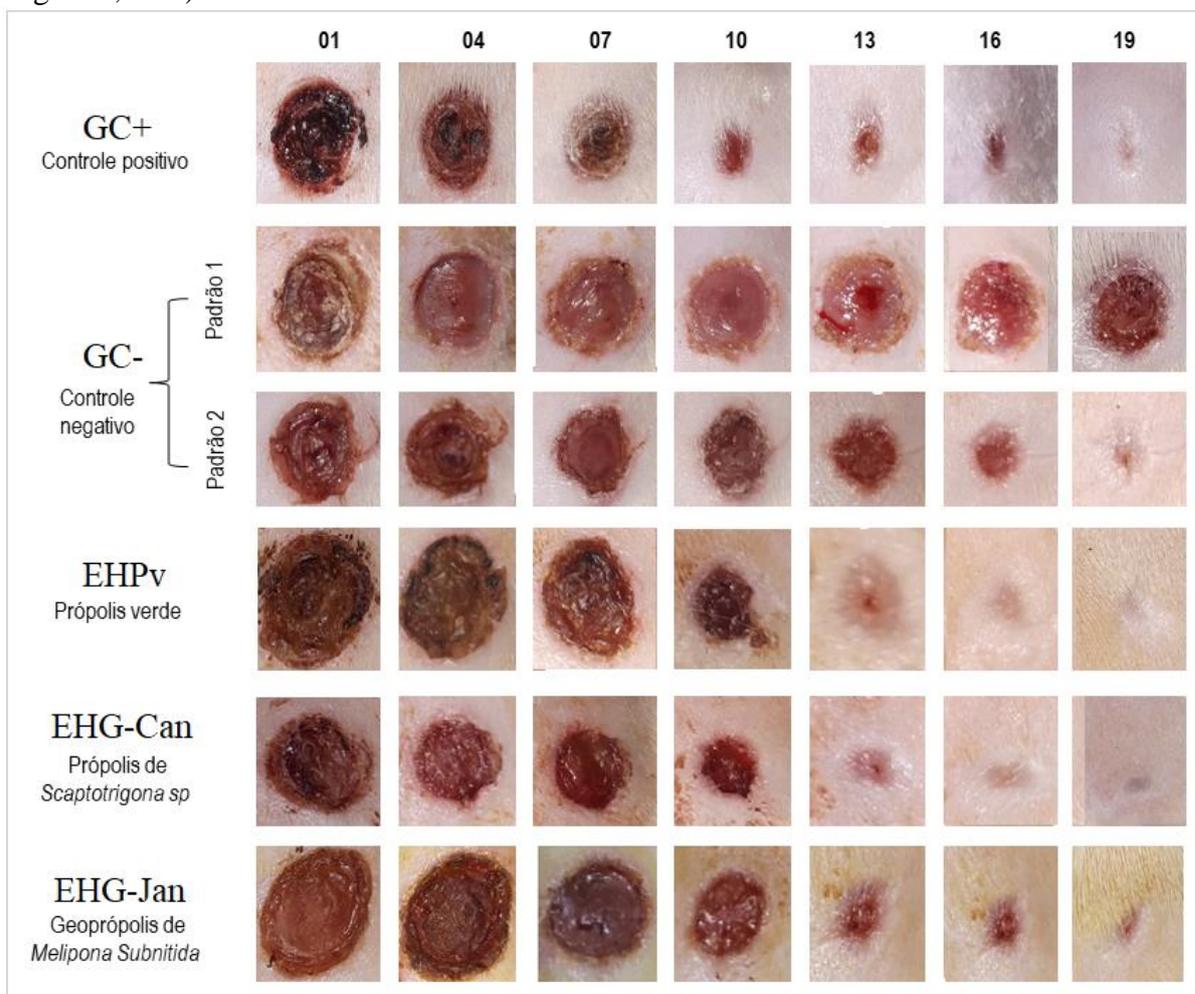
Figura 3 – Cicatrização de feridas circulares avaliadas por redução da área (cm^2) com plotagem em valores médios \pm desvios obtidos de ratos de linhagem Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), medicamento cicatrizante registrado (controle positivo, GC+) e apenas creme base (controle negativo, GC-).



Legenda: ^{abc} Letras diferentes alinhadas verticalmente na mesma hora indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
^{ns} Não significativo entre todos os grupos.

Na Figura 4 é possível observar a evolução no processo de reparo das feridas, comparando os grupos ao longo do tempo. As feridas dos grupos EHPv e EHG-Can apresentaram resultados similares ao do grupo GC+. Já as feridas do GC- exibiram dois padrões, o primeiro caracterizado pela não resolução da ferida no período experimental, e o segundo caracterizado pelo retardo na resolução.

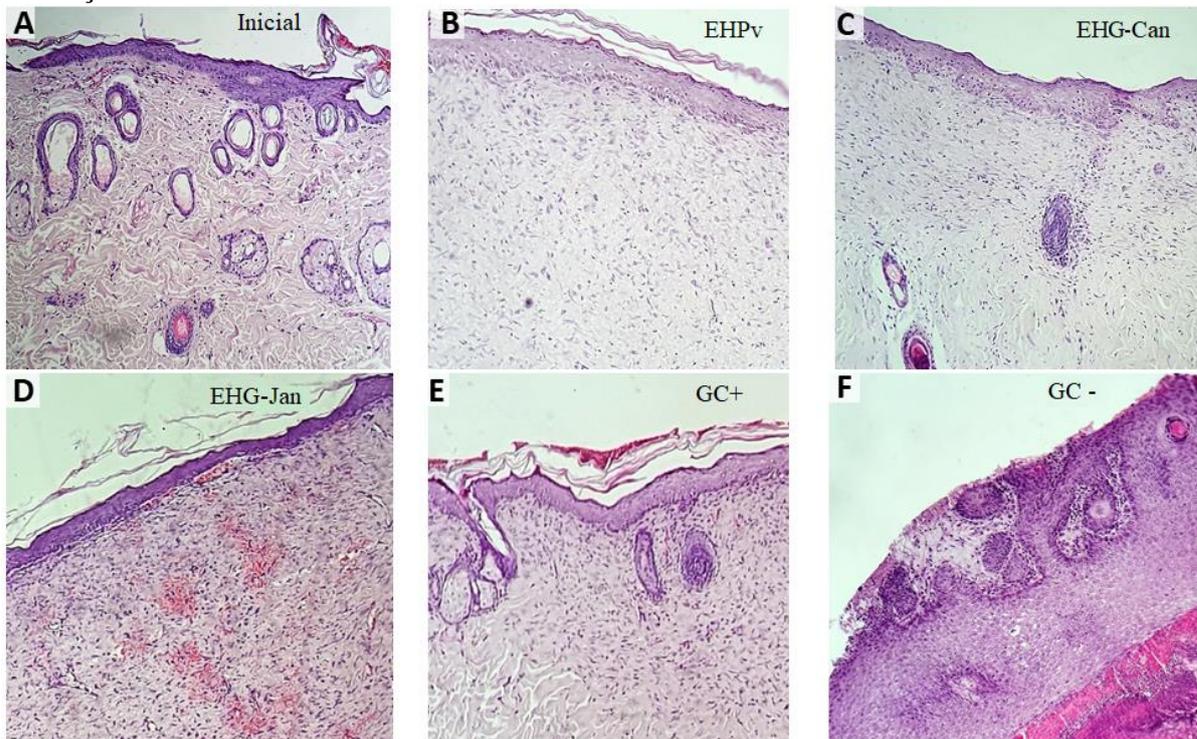
Figura 4 – Aspecto macroscópico das feridas circulares de ratos wistar tratadas com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), medicamento cicatrizante registrado (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-).



Fonte: Elaborada pelos autores.

Na análise histopatológica das feridas (Figura 5) observou-se nos grupos GC+, EHPv e EHG-Can completa reepitelização, o que sugere semelhanças na evolução e celeridade nos eventos de reparação tecidual do grupo EHPv e EHG-Can em relação ao fármaco registrado (GC+). No grupo EHG-Jan houve completa reepitelização, avançado remodelamento, deposição de colágeno com moderada presença de vasos sanguíneos, ou discreta presença.

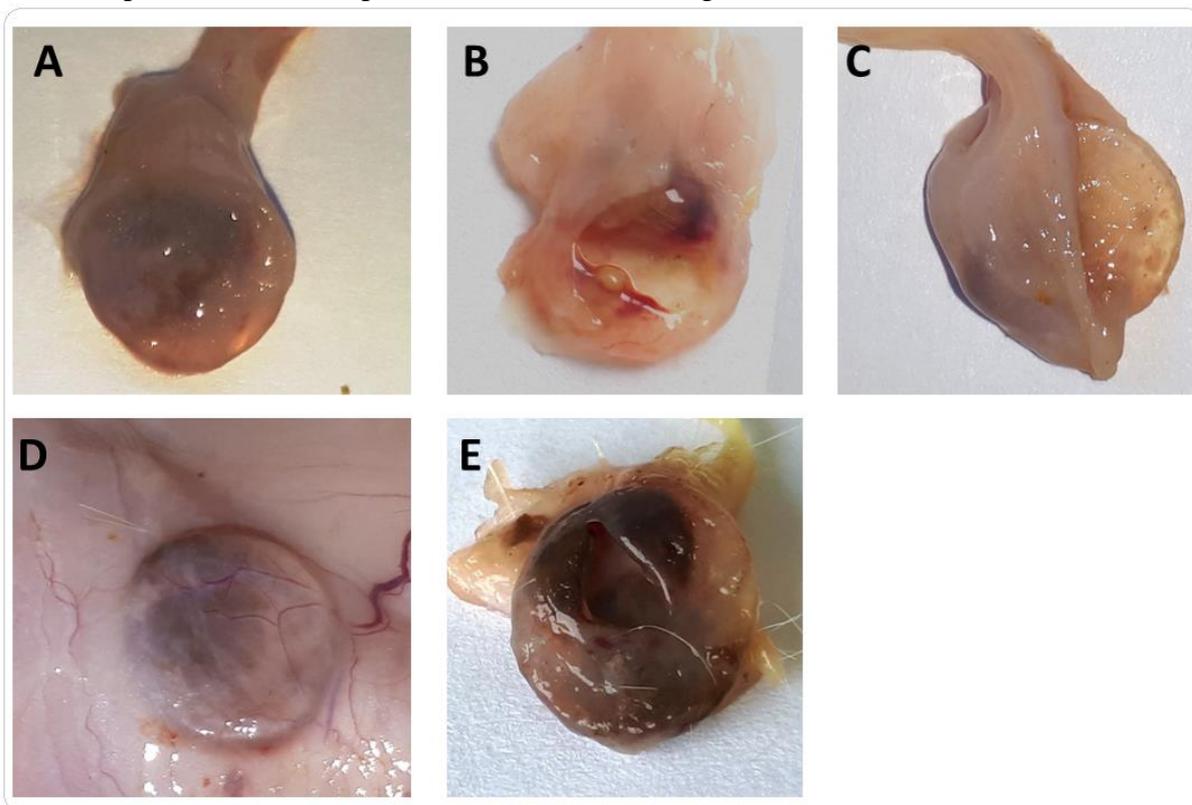
Figura 5 – Fotomicrografia de feridas de ratos Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), medicamento cicatrizante registrado (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-), em coloração HE em 10X.



A - Lâmina de pele inicial (normal). B - Completa reepitelização com espessura de epiderme discretamente irregular. C - Completa reepitelização. D - Reepitelização com atraso, estágio final do remodelamento com moderada quantidade de vasos sanguíneos e fibroblastos, pouco colágeno. E - Completa reepitelização, similar ao estado normal. F - Processo de reepitelização pouco uniforme com presença moderada de células polimorfonucleares, também com discreta presença de linfócitos. Fonte: Elaborada pelos autores.

Em relação à avaliação macroscópica da inflamação crônica (Figura 6), em todos os grupos houve a presença de envoltório intimamente aderido ao disco de vidro ao final do período experimental. As camadas do granuloma foram mais espessa e resistente ao corte nos grupos EHG-Jan e GC+, enquanto que nos grupos EHPv e GC- apresentaram maior presença de vasos. Todos os grupos apresentaram aderência considerável do disco ao granuloma.

Figura 6 – Apresentação macroscópica dos corpos estranhos conectados aos envoltórios recuperados de ratos Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), medicamento cicatrizante registrado (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-).

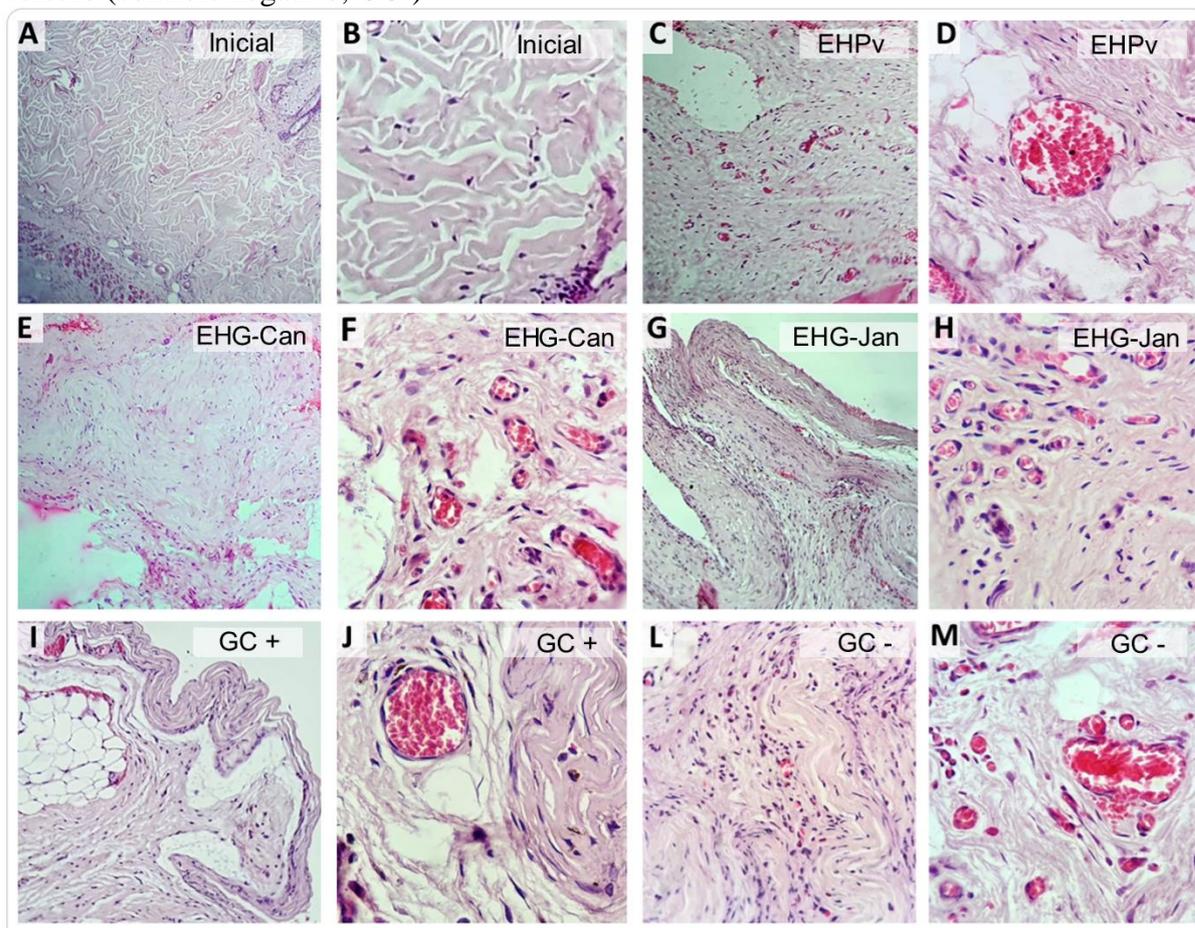


A - Grupo tratado com extrato hidroalcoólico de própolis verde (EHPv) de abelha melífera (*Apis mellifera* L.). B - Grupo tratado com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), envoltório do granuloma ainda aderido ao corpo estranho. C - Grupo tratado com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de abelha jandaíra (EHG-Jan), envoltório do granuloma ainda aderido ao corpo estranho. D - Grupo controle positivo tratado com formulação cicatrizante de mercado (GC+). E - Grupo controle negativo tratado apenas com pomada contendo creme base (GC-). Fonte: Elaborada pelos autores.

O resultado da análise histopatológica da inflamação crônica (Figura 7) mostrou presença de fibroblastos e tentativa de confinar o corpo estranho em cápsula de tecido conjuntivo. No grupo controle positivo (GC+), o granuloma de corpo estranho apresentou componentes histológicos típicos, mostrou-se bem definido com presença de macrófagos, moderada quantidade de fibroblastos e de colágeno, adicionalmente, apresentou vasos neoformados de considerável calibre ($>10\mu\text{m}$). Os granulomas do grupo GC- apresentaram camadas pouco evidentes, delimitação pouco perceptível, presença de numerosos vasos e de diferentes calibres. O grupo EHPv apresentou formação pouco definida do granuloma, variando consideravelmente até na espessura em torno do corpo estranho, contudo, foram observados fibroblastos, deposição de colágeno e células mononucleares. Também apresentou moderada presença de vasos com calibre considerável ($>10\mu\text{m}$). No grupo EHG-Can os granulomas se apresentaram morfológicamente semelhantes ao do grupo EHPv, ou seja, com

formação pouco característico de granuloma, no entanto houve discreta presença de vasos neoformados. No grupo EHG-Jan os resultados foram semelhantes ao do GC+, principalmente, em relação à presença dos constituintes histológicos do granuloma, porém diferiu discretamente na espessura da camada constituída de fibroblastos e nos vasos, que apesar de numerosos, exibiam menor tamanho luminal.

Figura 7 – Fotomicrografias de granulomas por corpo estranho, não imunogênico, em ratos Wistar tratados com própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial (controle positivo, GC+) e apenas veículo (controle negativo, GC-).



A - Lâmina de pele normal (10x). B - Lâmina de pele normal (40x). C - Formação irregular da camada de fibroblastos do granuloma, células mononucleares e moderada presença de vasos (10x). D - Vaso com grande luz vascular (40x). E - Formação de discreta camada de fibroblastos do granuloma, moderada presença de vasos (10x). F - Presença de vários vasos com calibres variáveis (40x). G - Formação da camada de fibroblastos do granuloma bem evidente com fibras de colágeno regularmente orientado (10x). H - Presença de vários vasos de calibres variáveis. I - Completa formação do granuloma, bem definido e regularmente orientado. J - Vaso com grande luz vascular (40x). L - Formação de granuloma pouco evidente, com razoável delimitação, e fibras de colágeno irregulares (10x). M - Presença de vários vasos de calibre variáveis, grande vaso à direita (40x). Fonte: Elaborada pelos autores.

Discussão

A obtenção do valor de pH é importante para verificar a ocorrência de falhas na obtenção e no processamento da própolis e seus derivados. Longhini et al. (2007) enfatizaram

a importância de se conhecer o pH no processo de extração, uma vez que auxilia na seleção e determinação das substâncias a serem extraídas por causa das características de polaridade e química. Eles também citam que o pH é um parâmetro sinalizador de prováveis erros no meio químico de extração e, quando preparado, servem também para proteger o produto do ataque de microrganismos (LONGHINI et al., 2007). Nesse aspecto, o pH das amostras deste estudo apresentou-se ligeiramente ácidas, no entanto dentro do que é observado na literatura (GONSALES et al., 2005). A condutividade elétrica pode ser usada também como indicador de má qualidade, adulteração e até de rastreamento de produtos apícolas, como no caso do mel (AGANIN, 1971), apesar de não figurar como teste corriqueiro para própolis, essa análise pode ser mais uma para caracterizar geoprópolis nordestina.

A respeito dos fenóis, a geoprópolis (EHG-Jan) diferiu das demais amostras por conter maior quantidade, esse achado concorda com o de Souza et al. (2015). Estes autores destacaram que o valor encontrado para o extrato de geoprópolis de *Melipona subnitida* do Alto Oeste Potiguar (RN) estava bem acima do preconizado em norma do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001) e que estava igual ou superior à amostra de própolis de abelha melífera. Apesar da maior quantidade de fenóis, não foi observada proporcionalidade de benefícios sobre a inflamação aguda e cicatrização com uso da geoprópolis (EHG-Jan).

Sobre os flavonoides, compostos importantes os quais são atribuídos muitos efeitos biológicos, como atividade antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (UZEL et al., 2005; VOLPI; LUSTOSA et al., 2008), neste experimento o grupo EHG-Jan também se sobressaiu, contudo a geoprópolis do grupo EHG-Can, com aproximadamente 2,36% da quantidade encontrada na geoprópolis EHG-Jan, apresentou resultados semelhantes apenas na atividade antiedematosa. Sobre a cicatrização, a maior quantidade de flavonoides, em termos gerais, não apresentou proporcionalidade com a atividade de cicatrização.

A atividade antioxidante guarda relação com os flavonoides (AHN et al., 2007), mas é importante destacar que esse poder antioxidante não fica restrito aos flavonoides posto que outros compostos, como os fenólicos, também são coparticipantes (MANI et al., 2006; VICENTINO; MENEZES, 2007). Neste experimento o grupo EHG-Can apresentou considerável poder antioxidante em comparação com a própolis do grupo EHPv, mesmo contendo pouco flavonoide e fenóis totais. O mesmo foi observado em estudos com geoprópolis de *Scaptotrigona postica* (“mandaguari”) oriunda do Rio Grande do Norte, no qual a amostra apresentou IC50 13% maior que da própolis verde potiguar (FERREIRA et al., 2017). Apesar disso, a amostra de própolis verde desse estudo apresentou valor maior que

amostras de extrato comercial de própolis verdes já descritas (SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

Para comparação dos resultados obtidos neste trabalho, adotou-se o uso de um grupo controle positivo, no qual foi utilizado fármaco de eficácia comprovada e benefício conhecido, e, também, um grupo controle negativo (apenas veículo), para estimar o sentido dos efeitos (positivos ou negativos) e até a intensidade desses efeitos. Ainda que os mecanismos de ação dos extratos não sejam totalmente conhecidos para comparação direta, em alguns aspectos os extratos expressaram resultados similares aos fármacos de eficácia e eficiência conhecidas.

Tratando-se do edema da inflamação aguda, Naito et al. (2007) afirmaram que uma pomada com própolis foi eficaz em reduzir edema provocado por carragenina e relacionou a quimiotaxia de células polimorfonucleares (PMN) à inibição promovida pela própolis. O mecanismo exato de como a própolis age sobre a inflamação aguda não foi completamente elucidado, o que se supõe é que alguns componentes da própolis possam atuar sobre o metabolismo do ácido araquidônico, fundamental para a cascata inflamatória (ROSSI et al., 2002). Sobre esse metabolismo, Mirzoeva e Calder et al. (1996) reconheceram os compostos eicosanoides como os mais importantes sobre a inflamação e, contra a atuação deles elencaram os flavonoides (quercetina e naringerina), assim como ácido cafeico fenetil éster (CAPE) presentes na própolis como os principais agentes anti-inflamatórios. Nesse sentido, as espécies específicas de flavonoides e os ésteres do ácido cafeico, provavelmente, foram os responsáveis pelo melhor resultado da própolis verde (EHPv). Os extratos de geoprópolis apresentaram intermediário poder antiedematoso, isso se deve – possivelmente – às diferenças químicas, sem descartar a possibilidade de interações antagônicas. Embora tenham apresentado perceptível atraso no efeito, ainda foram eficazes ao final do tempo experimental. Essa eficácia pode ser aprimorada com a variação dos solventes de extração, desse modo, concentrar as classes químicas mais efetivas. Não obstante, geoprópolis de outras regiões podem fornecer extratos com constituição química mais diversa e, possivelmente, até alguma mais eficaz.

Ainda sobre a inflamação aguda, a carragenina atua para a formação do edema inflamatório de fase aguda na primeira hora por causa da histamina e 5H-T. Aproximadamente pela segunda hora a bradicinina passa a atuar de modo significativo. A partir da terceira hora até a sexta hora após injeção de carragenina as prostaglandinas mantêm o pico edematoso (MARTINEZ; BOLAÑOS, 1979). Portanto, a curva de ação da atividade

antiedematosa sugere que o extrato hidroetanólico de própolis verde tem pouca influência sobre a histamina, mas age sobre a bradicinina e prostaglandina (PGE₂), descrevendo uma curva semelhante à de distribuição de Weibull (SANTOS; VIANNA; GAMBA, 2007).

O mecanismo de termorregulação visa homeostase do animal frente às variações de temperatura do ambiente e pode ser afetado tanto por fármacos como por diversas patologias (DE SOUZA; BATISTA, 2012; REZENDE et al., 2019, ARAÚJO; SILVA; SILVA, 2019). De forma geral, as injúrias fazem células de defesa (e.g. macrófago) produzir pirógenos endógenos, que por sua vez, agem nos neurônios termossensíveis da região pré-óptica do hipotálamo rostral, alterando o ponto ótimo de temperatura (*set-point*) por inibição dos neurônios sensíveis ao calor e exacerbação da sensibilidade de neurônios do frio, por consequência, dispara-se mecanismos geradores de calor, o que resulta num aumento sistêmico da temperatura na fase aguda, superando o limiar fisiológico e instalando-se o estado febril (VOLTARELLI, 1994; MACHADO, 2006). Tomando por base essas informações, os resultados não demonstraram efeito relevante da carragenina, isso provavelmente se deve a pequena quantidade administrada, não sendo perceptível o efeito dos grupos experimentais sobre a termorregulação.

O efeito cicatrizante da própolis é frequentemente ligado aos flavonoides, devido às inúmeras atividades biológicas associadas a essa categoria química, como atividade antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora, ativadora de macrófagos e indutora da atividade fagocítica (ORSOLIC; BASIC, 2003; SANTOS; VIANNA; GAMB, 2007; BARBOSA et al., 2009), tudo isso sem apresentar de efeito citotóxico (FRANCO, 2001; GOGIA, 2003). Diante disso, os resultados satisfatórios alcançados com a própolis verde podem ser explicados sob a luz da presença de flavonoides e também pela quantidade na amostra experimental. Em contradição, os animais do grupo EHG-Can também apresentaram redução no tempo de cicatrização, qualidade macroscópica e microscópica da cicatriz de modo similar à própolis verde mesmo contendo significativamente menos fenóis e flavonoides. Isso permite supor que a presença de certos flavonoides (biologicamente mais efetivos) e a interação sinérgica com outros compostos pode explicar melhor esse achado. A redução de ferida proporcionada pela geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan) foi eficaz, contudo não foi qualitativamente expressiva ou mais rápida que as demais amostras, além disso, não foi verificada proporcionalidade ou correlação positiva entre a quantidade de fenóis e flavonoides totais na cicatrização neste grupo. Cada espécie de abelha apresenta um perfil de pastejo nas espécies botânicas disponíveis (SILVA, 2016; ALVES; FREITAS, 2006). Nesse

sentido, as abelhas nativas não frequentam exatamente as mesmas plantas que as abelhas *Apis* para obterem as resinas e exsudatos base da geoprópolis, em razão disso, é possível ocorrer muita variação na composição química. Então, a constituição química peculiar, ignorando o efeito quantidade, nos permite supor que havia pouca variedade de flavanonas, flavonóis, flavonas e isoflavonas com efeitos cicatrizantes, ou, pelo contrário, alguns desses compostos deviam estar presentes em quantidade limitada e proporcionais para alcançar os melhores resultados.

A avaliação macroscópica e histopatológica das feridas indica que as pomadas contendo 20% de extratos hidroalcoólicos do grupo EHPv, EHG-Can e EHG-Jan apresentaram efeito positivo na reepitelização em até 18 dias e avanço na fase de remodelamento tecidual. Embora a geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan) não tenha induzido a redução de área da ferida na mesma velocidade dos demais grupos, houve resolução em 18 dias de igual modo aos outros grupos. Neste trabalho, os resultados encontrados para a própolis sobre cicatrização de feridas assemelha-se com o que está documentado por Santos; Vianna; Gamba (2007), Barbosa et al. (2009) e SILVA et al. (2016). Estes autores atribuem aos flavonoides e ácidos fenólicos (em maior quantidade) as principais influências positivas da própolis sobre diversos processos fisiológicos, diante disso é possível entender a preferência do mercado internacional à própolis brasileira (MENEZES, 2005, PARK et al., 2002a; PARK et al., 2002b; FUNARI; FERRO, 2006), como é possível supor que os processados de geoprópolis possam também alcançar boa recepção do mercado. A geoprópolis de abelha Canudo (EHG-Can) induziu resultados macroscópicos relativamente superiores à própolis verde, contendo consideravelmente menos flavonoides. Isso pode ser explicado pelas muitas outras classes químicas envolvidas e a presença de flavonoides específicos para que o processo cicatricial ocorra de modo mais rápido e, principalmente, para que exiba uma aparência de cicatriz limpa e uniforme.

Pouco se sabe a respeito do mecanismo de ação da própolis e geoprópolis no tratamento de inflamação crônica, tanto em inflamação induzida experimentalmente como em feridas crônicas. O que se sabe é que o efeito anti-inflamatório sobre pacientes com asma, inflamação crônica das vias aéreas, foi semelhante ao do glicocorticoide (BARNES,1995). Ainda com humanos, de 22 pacientes que apresentavam úlceras crônicas (diabéticas, por pressão e vasculares) e que foram tratados com própolis, 16 pacientes (74,1%) exibiram cicatrização em até 140 dias (média de 92 dias) (SANTOS; VIANNA; GAMBA, 2007). Também há relato de que a própolis vermelha (Cuba) foi capaz de influenciar no processo

inflamatório em granuloma induzido por corpo estranho não absorvível, por meio de fios de algodão (LEDÓN et al., 1997). No presente estudo, os resultados demonstram que os cremes utilizados nos diferentes grupos foram capazes de penetrar o tecido cutâneo e produzir efeito sobre o granuloma por corpo estranho. O extrato de geoprópolis (EHG-Jan) induziu a formação de granuloma com qualidade superior que o do grupo controle negativo e foi semelhante ao grupo que utilizou pomada com princípios farmacológicos registrados (GC+). Sob a perspectiva de constituintes químicos, a geoprópolis (EHG-Jan) foi a que apresentou a maior quantidade de fenóis e flavonoides, e menor atividade antioxidante. Embora organismos suplementados com dietas ricas em antioxidantes apresentem maior resistência a algumas doenças inflamatórias, inclusive crônicas (HORST; LAJOLO, 2012; DALEPRANE; ABDALLA, 2013), é provável que a maior quantidade de compostos aromáticos, já citados, seja o condicionante principal do melhor desempenho do grupo EHG-Jan na formação do granuloma, pois não é possível descartar efeito de algum composto sobre os fibroblastos.

Sobre a irrigação sanguínea, De Moura (2009) verificou, ao estudar o efeito angiogênico de própolis verde sobre implante de esponja não-absorvível em camundongos, que houve aumento progressivo de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), mas detectou redução após o décimo dia que, na análise do autor, reuniu características de ação contra a angiogênese. Em contradição, alguns autores relatam neoformação de vasos de modo satisfatório com uso de própolis e geoprópolis em animais (BATISTA et al., 2012; SILVA et al., 2016). Neste estudo, os grupos com retardo no desenvolvimento do granuloma apresentaram com maior frequência aglomerados de capilares e vasos de calibre variável. Esse padrão sugere que os extratos não influenciaram negativamente na angiogênese nem exacerbaram a um ponto notável. O suprimento sanguíneo satisfatório conforme a demanda tecidual pode ser explicado pelo rigoroso controle ao qual angiogênese está submetida, justamente por ser crítico ao organismo a circulação sanguínea. Para Brooks (1996) e Liekens et al. (2001) a cascata de eventos é rigorosamente regulada, limitada às células afetadas, ativada (e.g. integrinas) por um curto período de tempo e, em seguida, totalmente suprimida. Nesse contexto, é possível supor que o extrato de geoprópolis atuou, por mecanismo ainda desconhecido, em um ou mais mediadores inflamatórios, por consequência, induziu a formação de granuloma e as células envolvidas, por sua vez, demandaram suprimento suficiente de acordo com a etapa alcançada.

Conclusão

O extrato hidroalcoólico de própolis verde apresentou o melhor efeito antiedematoso da inflamação aguda em comparação aos demais extratos.

O extrato de própolis verde e de geoprópolis de canudo (*Scaptotrigona sp.*) promoveram rápida resolução de ferida, similar ao fármaco cicatrizante (Crema 6A). Enquanto a geoprópolis de abelha canudo exibiu o melhor aspecto visual de cicatrização de feridas.

O extrato hidroalcoólico geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) apresentou formação mais adiantada e bem definida de granuloma de corpo estranho, superando os demais extratos testados.

Referências

- ALVES, José Everton; FREITAS, Breno Magalhães. Comportamento de pastejo e eficiência de polinização de cinco espécies de abelhas em flores de goiabeira (*Psidium guajava L.*). **Revista Ciência Agronômica**, 2006, 37.2: 216-220.
- AGANIN, A. F. Electrical conductivity of several unifloral honeys. **Trudy Saratovskogo Zootekhnicheskogo Inatituta**, v.21, p.137-144, 1971.
- AHN M, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China. **Food Chemistry** 101: p.1383-1392, 2007.
- ARAÚJO, Lamarca G. S.; SILVA, Lamarca G.; SILVA, Marco Antônio B. A importância dos mecanismos de termorregulação do organismo durante a atividade física. **Repositório UNIT**, p.3, 2019.
- BALBINO, Carlos Aberto; PEREIRA, Leonardo Madeira; CURI, Rui. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 1, n.1, p.27-51, 2005.
- BANKOVA, Vassya S.; DE CASTRO, Solange L.; MARCUCCI, Maria C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.
- BANSKOTA, A. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. Downers Grove, **J Nat Prod**, v.61, n.7, p.896-900, 1998.
- BARACHO, Nilo César Vale, et al. Extrato hidroalcoólico de própolis e cicatrização de feridas no diabetes tipo I: Estudo experimental. 2ªed, Itajúba, **Revista Científica da FEPI-Revista Científica Universitas**, p.12-17, 2009.

- BARBOSA, M. H., Zuffi, F. B., Maruxo, H. B., & Jorge, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.22, n.3, p.318-322, 2009.
- BARBOSA, Maria Helena, et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.22, n.3, p.318-322. 2009.
- BARNES, Peter J. Molecular mechanisms of antiasthma therapy. **Annals of medicine**, v.27, n. 5, p.531-535, 1995.
- BATISTA, Lara Livia Valença et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n.6, p. 515-520, 2012.
- BERNARDO, C. D. L. E., Souza, I. A., Colavitti, C., & Garcia, C. . Própolis: cicatrizante e antibiótico natural. Brasília, **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.43, n.1-4, p.101-106, 1990.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen apícola, Própolis e Extrato de Própolis Brasília, 2001.
- BROOKS, Peter C. Role of integrins in angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 32, n. 14, p. 2423-2429, 1996.
- DA CUNHA, Marcos Guilherme et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n.1, p.23, 2013.
- DALEPRANE, Julio Beltrame; ABDALLA, Dulcinéia Saes. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, 2013.
- DE SOUSA, Déborah Munique Nogueira. Prospecção fitoquímica, toxicidade in vitro e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.2, p.134-140, 2015.
- DE SOUZA, Bonifácio Benicio; BATISTA, Nyanne Lopes. Os efeitos do estresse térmico sobre a fisiologia animal. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 8, n. 3, p. 06-10, 2012.
- FERNANDES JÚNIOR, Ary et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p. 294-297, 2006.
- FERREIRA, Joselena M. et al. Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and likely botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2017, 2017.
- FERREIRA, Joselena M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.97, n.11, p.3552-3558, 2017.
- FISCHER, G. et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n. 2, p. 247-53, 2008.

FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, n.2, p.709–715, 2012.

FRANCO SL. Própolis: Otimização do processo extrativo. Desenvolvimento de técnicas de controle de qualidade e produção de forma farmacêutica sólida [tese de doutorado]. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista**; Araraquara, 2001.

FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise de própolis. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GOGIA PP. Feridas: tratamento e cicatrização. Rio de Janeiro: **Revinter**; p.192, 2003.

GONÇALVES FILHO, Antonio et al. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 3-8, (2006).

GONSALES, G.Z., Orsi, R.O., RODRIGUES, P. e FUNARI, S.R.C. 2005. Análises físico-químicas de extrato alcoólico de própolis. **Boletim Industrial Animal**, Nova Odessa, v.62, p.215-9, 2005.

HORST, M. A.; LAJOLO, F. M. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. **Nutrição Clínica Estética**. Belo Horizonte – BH. p.12-18, 2011.

LAMBERT, J.B; POINAR, G.O. Jr. Amber: the organic gemstone. **Acc. Chem. Res.** p.8-22, 2003.

LEDON, N. et al. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Zhongguo Yao Li Xue Bao-Acta pharmacologica Sinica**, v. 18, n. 3, p. 274, 1997.

LEMBI, Isabela C.; ALVIM, Fabiane A. S. Técnicas de reparo das lesões cutâneas em animais de companhia-revisão de literatura. **Ciência Veterinária UniFil**, v.1, n.3, p.11-32, 2019.

LIEKENS, Sandra; DE CLERCQ, Erik; NEYTS, Johan. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical pharmacology**, v.61, n.3, p.253-270, 2001.

LONGHINI, Renata et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p. 388-395, 2007.

LUSTOSA, Sarah R., et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. João Pessoa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

MACHADO, Renes de Resende. Mediadores envolvidos na resposta febril induzida pela RANTES. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, **Repositório USP**. 2006

MADJAROF, Cristiana et al. Atividade antitumoral, antiinflamatória e antiulcerogênica de duas variedades de própolis brasileira, Tese de doutorado. **Repositório UNICAMP**. 2009.

MANI F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J Ethnopharmacol**, v.105, p.95-98, 2006.

- MARCUCCI, María Cristina et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105-112, 2001.
- MARCUCCI, Maria Cristina et al. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996.
- MARINHO, Polyana Cury. O papel benéfico das plantas medicinais na cicatrização de feridas cutâneas em modelos experimentais: uma revisão da literatura. **Revista de Ciências da Saúde Básica e Aplicada**, v. 1, n. 1, p.10-26, 2018.
- MARTÍNEZ M, BOLAÑOS R. Antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos. In: Bazerque, Buenos Aires: **Ediciones Toray Argentina**, p.57-85, 1979.
- MEDA, Aline, et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, n.3, p.571-577, 2005.
- MENEZES, Hermes. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 405-411, 2005.
- MIRANDA, Marina Barcelos de. Efeitos da administração do extrato hidroalcoólico de própolis verde no processo inflamatório de camundongos submetidos à dieta hipoproteica. Dissertação. Ouro preto, **Repositório UFOP**, p.31, 2018.
- MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.55, n.6, p.441-449, 1996.
- NAITO, Y.; Yasumuro, M.; Kondou, K.; Ohara, N. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytother Res.** v.21, n.5, p.452-456, 2007.
- NAITO, Yukiko et al. Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v.21, n.5, p.452-456, 2007.
- ORŠOLIĆ, Nada; BAŠIĆ, Ivan. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84.n.2-3, p.265-273, 2003.
- PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciênc Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002a.
- PARK, Yong K.; ALENCAR, Severino M.; AGUIAR, Claudio L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.9, p.2502-2506, 2002b.
- PARK, Yong Kun et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. Campinas. **Food Science and Technology**, v.18, n.2, p.313-318, 1998.

- PINTO, Luciana de M. A.; DO PRADO, Ney Robson T.; DE CARVALHO, Lucas Bragança. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de farmácia**, v.8, n.3, p.25-26, 2011.
- REIS, C. M. F., et al. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. Maringá. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.9, n.1, p.43-52, 2000.
- REZENDE, Leonardo Mateus Teixeira de et al. Estresse térmico ambiental e termorregulação em jogadores de futebol: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 41, n. 1, p. 10-25, 2019.
- ROSSI, A. et al. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. **Phytomedicine**, v.9, n.6, p.530-535, 2002.
- SALAZAR, R., NOGUEIRA, A. J. M., MAGALHÃES, P., OLIVEIRA, P., COLAÇO, B., & PIRES, M. J. Avaliação da função renal em ratos wistar com insuficiência renal. **V Jornadas de Biologia**. 2011.
- SALGUEIRO, Fernanda B.; CASTRO, Rosane N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. *Química Nova*, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.
- SANTOS, M. J. D., VIANNA, L. D. A. C., GAMBA, M. A. . Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.20, n.2, p.199-204, 2007.
- SAWAYA, Alexandra Christine Helena Frankland; DA SILVA CUNHA, Ildenize Barbosa; MARCUCCI, Maria Cristina. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. Campinas-SP. **Chemistry Central Journal**, v.5, n.1, p.1-10, 2011.
- SFORCIN, José Maurício; BANKOVA, Vassya. Propolis: is there a potential for the development of new drugs. Botucatu, **Journal of ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.253-260, 2011.
- SILVA J.B; COSTA, K. M.F.M.; COELHO, W. A.C.; PAIVA, K.A.R.; COSTA, G. A.V.; SALATINO, A.; FREITAS, C. I.A. BATISTA, J.S. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de Plebeia aff. Flavocincta do Rio Grande do Norte. Rio de Janeiro–RJ, **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.36. n.9, p77-97, 2016.
- SILVA, J. M. B. D. Prospecção fitoquímica, antioxidante e atividade antibacteriana do extrato da resina exsudada de albizia lebeck. Monografia. Universidade Federal de Campina Grande. **Repositório UFCG**, p.22-25. 2017.
- SILVA, Ana Paula Conceição. Perfil palinológico do mel e pólen de Melipona asilvai Moure: uma análise do espectro polínico de amostras coletadas simultaneamente em uma área de caatinga na Bahia, Brasil. **Repositório UEFS**, p5-80, 2016
- UZEL A, Sorkun K, Öncag Ö, Çogulo D, Gençay Ö, Salih B 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiol Res**. v.160, p.189-195, 2005.

VELAZQUEZ, E., Tournier, H. A., De Buschiazzo, P. M., Saavedra, G., & Schinella, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, n.1-2, p.91-97, 2003.

VICENTINO, Amanda RR; MENEZES, Fábio de Sousa. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.384-387, 2007.

VOLPI N, Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal**. v.42, p.354-361, 2006.

VOLTARELLI, Júlio C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.27, n.1-2, p.7-48, 1994.

WITTE MB, BARBUL A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. Rio de Janeiro: Interlivros, **Clínicas Cirúrgicas da América do Norte**, p.02-11, 1997.

5. CAPÍTULO II

EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E GEOPRÓPOLIS DE ABELHA CANUDO (*Scaptotrigona sp.*) e JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) SOBRE A VIABILIDADE DE TRANSPLANTE CUTÂNEO AUTOGÊNICO E ALOGÊNICO EM RATOS (*Rattus norvegicus*) DA LINHAGEM WISTAR

EFFECT OF GREEN PROPOLIS AND GEOPROPOLIS FROM CANUDO BEE (*Scaptotrigona sp.*) AND JANDAIRA BEE (*Melipona subnitida*) EXTRACTS ON A FEASIBILITY OF AUTOGENIC AND ALLOGENIC CUTANEOUS TRANSPLANTATION IN WISTAR RATS (*Rattus norvegicus*)

Artigo 2 submetido a um periódico A2

MOSSORO-RN, 2020

Efeito de extratos de própolis verde e geoprópolis de abelha Canudo (*Scaptotrigona sp.*) e Jandaíra (*Melipona subnitida*) sobre a viabilidade de transplante cutâneo autogênico e alogênico em ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar

*Effect of green propolis and geopropolis from Canudo bee (*Scaptotrigona sp.*) and Jandaíra bee (*Melipona subnitida*) extracts on a feasibility of autogenic and allogenic cutaneous transplantation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*)*

Parmênedes Dias de Brito^{I*}, Fernanda A. dos Santos^I, Michelly F. de Macedo^I, Jael S. Batista^I, Carlos Iberê Alves Freitas^I

^IUniversidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Av. Francisco Mota, Presidente Costa e Silva, Mossoró, RN 59625-900, Brazil. * Autor para correspondência: parmenedesdbrito@gmail.com.br.

RESUMO – A própolis e geoprópolis são produtos resinosos elaborados pelas abelhas a partir da coleta de exsudatos de plantas, sendo conhecidas popularmente pelos seus efeitos medicinais diversos. Pelos recorrentes relatos de efeito cicatrizante, angiogênico e imunomodulador, oportuniza-se um estudo em transplantes. Nesse sentido, objetivou-se avaliar os efeitos protetores e imunomodulador dos extratos hidroalcoólicos de própolis e geoprópolis de abelhas nativas sobre enxertos cutâneos autogênicos e alogênicos. Para tanto, foram utilizados 20 animais divididos em cinco grupos de quatro animais cada. Os grupos foram tratados com extratos hidroalcoólico de própolis verde (EHPv) de *Apis mellifera*, geoprópolis de *Scaptotrigona sp.* (EHG-Can), geoprópolis de *Melipona subnitida* (EHG-Jan), medicamento registrado como controle positivo (GC+), e apenas creme base como controle negativo (GC-). Após anestesia, foram obtidos dois enxertos, um cranial e um caudal, onde o caudal foi transferido para a ferida cranial (autotransplante) e o enxerto cranial foi transferido para outro animal (alotransplante). Posteriormente, os animais foram acompanhados clinicamente por 15 dias. Ao final desse período, coletaram-se fragmentos de pele, junção integrada e enxerto para exame histopatológico e 1 ml de sangue para realização de hemograma e bioquímica sérica. Não foi verificada diferença entre os grupos em relação aos resultados obtidos no hemograma, plaquetograma e na bioquímica sérica. No leucograma, o grupo GC- apresentou considerável aumento de neutrófilos, indicando infecções secundárias por falta de proteção da ferida. Na macroscopia, foi verificado melhor aspecto do tecido nos grupos GC+, EHPv e EHG-Can, tanto nos transplantes autogênicos quanto alogênicos. Sobre a análise histológica, foi verificado que os tratamentos que utilizaram extratos apresentaram infiltrado celular inflamatório, vasos neoformados, bem como presença de linfócitos, macrófagos e reepitelização similar ao grupo GC+. Contudo, na análise celular, os grupos apresentaram migração de leucócito igualmente distribuído ($p > 0,05$) bem como presença de linfócitos ativados e macrófagos. O extrato hidroalcoólico de própolis verde, geoprópolis de abelha canudo e geoprópolis de abelha jandaíra exibiram proteção contra infecções secundárias e integração nos autoenxertos e discreto retardo na rejeição no aloenxertos.

Palavras-chave: Enxerto cutâneo, autoenxerto, aloenxerto, abelha sem ferrão, *Apis mellifera*.

ABSTRACT – Propolis and geopropolis are resinous products made by bees from the collection of plant exudates, and are popularly known for their diverse medicinal effects. Due to recurrent reports of healing, angiogenic and immunomodulatory effects, a study in transplants is opportune. In this sense, the objective was to evaluate the protective, angiogenic and immunomodulatory effects of hydroalcoholic extracts of green propolis and bee geopropolis canudo and jandaíra on autogenic and allogenic skin flaps. For this, 20 animals were used, divided into 5 groups of 4 animals each. The groups were treated with hydroethanolic extracts of green propolis (HEP) of *Apis mellifera*, geopropolis of *Scaptotrigona sp.* (HEG-Can), geopropolis of *Melipona subnitida* (HEG-Jan), Market formulation as positive control (GC+), and only vehicle as negative control (GC-) . Two grafts were obtained, a cranial and a caudal, where the caudal was transferred to the cranial wound (autograft) and the caudal flap was transferred to another animal (allograft), since then the animals have been followed clinically for 15 days, then it was removed fragment containing skin and graft for histopathological examination. The animals maintained a good state of health after surgery, had similar temperatures ($P > 0.05$) and also on behavioral parameters. There were no differences between groups regarding parameters in the erythrogram, leukogram, platelet and serum biochemistry. The GC- group presented neutrophils, which characterizes constant secondary infections due to lack of wound protection. Macroscopy showed a better aspect of the control group of GC +, HEP and HEP-Can, both in autogenic and allogenic transplants. Regarding the histological analysis, it was verified that the treatments presented inflammatory cell infiltration, presence of vessels, as well as the presence of activated lymphocytes, macrophages and reepithelization similar to the GC + group. However, in the cellular analysis, the groups showed leukocyte migration equally distributed ($p > 0.05$) as well as the presence of activated lymphocytes, macrophages. The hydroalcoholic extract of green propolis, canudo bee geopropolis and jandaíra bee geopropolis exhibited protection and integration in the autografts and a slight delay in rejection in the allografts.

Keywords – Cutaneous graft, autograft, allograft, stingless bees, *Apis mellifera*,

Introdução

A própolis e a geoprópolis, que contém alguma fração terrosa, são materiais resinosos produzidos por abelhas com a finalidade de construir, reforçar e vedar estruturas da colônia (KERR, 1987; IKEGAKI et al., 2001; SILVA et al., 2013; LONGHINI et al., 2007; SIMÕES et al., 2008), bem como para a higiene individual e coletiva das abelhas (STOCK et al., 2010). A base resinosa é oriunda de exsudatos obtidos de plantas-alvo ao redor da colônia (PARK et al., 2002), com o acréscimo de pólen e cera, por essa razão, sua composição varia conforme a situação fitogeográfica do local (FUNARI; FERRO, 2006; FISCHER et al., 2008).

As propriedades terapêuticas da própolis ainda não foram totalmente elucidadas (BARBOSA et al., 2009; ARAÚJO, 2013), já sobre a geoprópolis, os estudos são relativamente muito mais incipientes. Ainda que as propriedades e benefícios atribuídos a

esses produtos resinosos ainda não estejam em modelos preditivos para todos os achados, essa falta de domínio sobre o potencial e aplicabilidade não impede o uso por parte de populares ao redor do mundo em incontáveis finalidades (DUTRA et al., 2008). Até o momento, há informações que relacionam, em diferentes graus, algum efeito antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, cicatrizante, antitumoral, imunoestimulante e imunossupressor (FISCHER et al., 2008). Embora esses últimos dois efeitos pareçam conflitantes, é importante o aprofundamento nos estudos para determinar em quais situações a imunoestimulação e imunossupressão podem ser verificadas, por consequência, devem ser dominadas para aproveitamento de maneira consciente e eficaz pelos médicos veterinários em terapias alternativas ou complementares, incluindo transplantes.

Transplante é uma intervenção médica delicada, pois a tendência do organismo é destruir os antígenos presentes no local injuriado e rejeitar qualquer tecido enxertado (*non-self*) (PEREIRA FILHO et al., 2009). Para o sucesso de um transplante é necessário o atendimento de vários requisitos, um deles é a imunossupressão, ainda que temporária. A imunossupressão é necessária para se alcançar algum benefício ou sobrevida relevante para os pacientes (FISCHER et al., 2008), principalmente quando se trata de transplante alogênico. Adicionalmente, a manutenção do aporte sanguíneo com a neoformação vascular constitui ponto crucial para manter a nutrição até a completa integração tecidual. Nesse caso, espera-se que nenhum fenômeno imunológico ligado à dinâmica dos tecidos transplantados (doador e receptor) interfira na adequada angiogênese (MENEGHELLI et al., 2013).

Sobre os efeitos da própolis, é perceptível a existência de trabalhos científicos que sugerem ocorrência de satisfatória angiogênese em estudos com cicatrização (SILVA et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; ABU-SEIDA, 2015; BATISTA et al., 2012), bem como relatos de ação imunomoduladora (ORSOLIC; BASIC, 2003; FISCHER et al., 2008). Tais efeitos reunidos descrevem a possibilidade de um importante aliado no tratamento de tecidos transplantados, haja vista que estes precisam conter a resposta imune citotóxica, precisam de irrigação sanguínea e de proteção contra contaminação oportunista (HERMETO; De ROSSI, 2012; DE OLIVEIRA; FARIA, 2019). Para Sforcin e Bankova (2011) faltam aplicações e estudos clínicos para concretizar o alcance dos benefícios desses materiais resinosos. Nesse sentido, alcançar novas formas de tratar animais de modo mais específico com produtos auxiliares (preparados à base de própolis e geoprópolis) abre a possibilidade de também ser usado em humanos.

Por existir algumas dúvidas sobre aplicabilidade destes produtos resinosos em procedimentos complexos, como transplante, e devido à influência da própolis e geoprópolis sobre a imunomodulação em enxertos ainda ser pouco conhecida (CONTE, 2017), se faz necessário uma contribuição experimental com uma com dupla abordagem, avaliando o quão benéficas podem ser as propriedades cicatrizantes e imunomoduladoras sobre o autotransplante e sobre alotransplantes.

Portanto, objetivou-se avaliar, comparativamente, a viabilidade e alterações em enxertos cutâneos autólogos e alogênicos de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) tratados com extratos hidroalcoólicos de própolis verde de abelha africanizada (*Apis mellifera*), geoprópolis de abelha canudo (*Scaptotrigona sp.*) e geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*).

Material e Métodos

Local do estudo

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Imunologia e Animais Silvestres (LEIAS) e no Laboratório de Patologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizada no município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.

Espécie animal

Foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar) adultos, saudáveis, não castrados e de ambos os sexos, oriundos do LEIAS/UFERSA. Os animais foram mantidos em manejo de luz:escuridão de 12/12h a 21°C, alimentados com ração apropriada para ratos (Linha laboratorial - Presence®) e água *ad libitum*.

Parecer ético

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - CEUA/UFERSA sob número 23091.006656/2019-28 e realizado de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Obtenção das amostras e elaboração dos extratos de própolis e geoprópolis

As amostras de própolis verde foram obtidas na cidade de Nazaré - MG, Brasil, tendo como origem botânica predominante o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). O extrato da própolis foi obtido pela técnica de maceração de própolis (etanol 83,8% na proporção 1:3 [p/v] durante 20 dias sob agitação frequente). A partir do extrato obtido, foi procedida a eliminação do solvente, por evaporação rotativa, para que o solvente não causasse nenhum dano às atividades celulares (PARK et al., 1998).

As amostras de geoprópolis frescas utilizadas foram de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke, 1910), obtida do município de São João do Rio do Peixe-PB, Brasil, e de abelha canudo (*Scaptotrigona sp.*) obtida de meliponicultores da zona rural do município de Aquiraz - CE, Brasil. A obtenção dos extratos foi realizada de acordo com Silva et al. (2016), a saber: 60g das geoprópolis foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar a 40°C por 48h, trituradas em multiprocessador por cinco minutos, até a obtenção de um pó fino e homogêneo. Após esse processamento, o material foi pesado e solubilizado em solução hidroalcoólica a 70% na proporção de 1:3 do pó, posteriormente foi depositado em recipiente de vidro âmbar para fotoproteção. Para que houvesse a máxima solubilização do geoprópolis a mistura foi mantida sob agitação frequente durante 20 dias a temperatura ambiente. Ao término do processo de solubilização da mistura, o sobrenadante foi filtrado com papel filtro para retenção de partículas insolúveis.

Análises físico-químicas extratos de própolis e geoprópolis

O pH das amostras foi medido utilizando-se de um pHmetro digital Tecnal modelo Tec-3MP previamente calibrado com solução tampão (pH = 4,0 e 7,0). Para avaliar a condutividade elétrica foram realizadas medidas utilizando-se de um condutivímetro da marca Tecnopone modelo mCA 150, com o eletrodo do condutivímetro devidamente estabilizado foram obtidas medidas em Microsiemens (μS).

A atividade antioxidante foi mensurada de acordo com o método de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), descrito por Velazquez et al. (2003), adaptado. Este método consistiu no uso de reagente antioxidante, que declinou a coloração púrpura do DPPH, podendo assim ser lida por espectrofotometria devido à mudança de absorvância. Uma alíquota de 1 mL de cada diluição (2-10 $\mu\text{L/mL}$) do extrato obtido foi adicionada em 1,5 mL

de DPPH (0,029 mg/mL) e após agitação, os tubos foram deixados em repouso ao abrigo da luz por 15 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas através do espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G a 517 nm utilizando o controle 1 mL metanol e DPPH. A atividade antioxidante dos extratos foi obtida considerando o percentual de inibição do radical DPPH, calculado conforme equação: $INIBIÇÃO (\%) = [(Abs. \text{ controle} - Abs. \text{ amostra}) / Abs. \text{ controle}] \times 100$.

A concentração apropriada para inibir a metade da inibição máxima (IC50) é a medida da eficácia de um composto na função biológica ou bioquímica de inibição, que liga inversamente o percentual de atividade contra a concentração da substância ensaiada. Sendo assim, quanto menor o valor de IC50 maior será a capacidade antioxidante da substância. Foram elaboradas curvas %inibição versus concentração para cada extrato a fim de calcular o valor de IC50. Os parâmetros de regressão linear foram planejados para cada curva em software Origin 7.0.

Os fenóis totais foram determinados conforme a metodologia de Meda et al. (2005), através do uso do reagente Folin-Ciocalteu. A partir dos extratos de própolis (20 ppm), retiraram-se alíquotas de 0,5 mL, adicionou-se 2,5mL do reagente Folin-Ciocalteu (0,2N) em tubo de ensaio, após 5 minutos colocou-se 2 mL de carbonato de sódio (75 g/L) e foi mantido em repouso por 2 h ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotometria Gehaka modelo UV-340G a 760nm, utilizando branco metanol. Os resultados obtidos foram extrapolados em curva de calibração obtida com padrão ácido gálico (20 a 200 ppm), e expressos em mg equivalente ácido gálico (EAG)/100mL de extrato.

Flavonoides totais foram obtidos conforme metodologia descrita na literatura (MEDA et al., 2005), com adaptações. Alíquota de 5,0 mL do extrato de própolis (20 ppm) foi misturada com 5 mL de cloreto de alumínio (2%), em tubo de ensaio. Após 10 minutos, a absorbância foi lida no espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G em comprimento de onda de 415 nm, utilizando como branco a amostra com metanol sem AlCl₃ para cada amostra. Uma curva de quercetina (5 a 50 mg/L) foi usada como padrão. O conteúdo de flavonoides foi expresso em mg de equivalente quercetina (EQ)/100mL de extrato.

Elaboração do creme dermatológico experimental

Para facilitar a aplicação dos extratos, simular condições de uso normal de mercado, e por apresentar elevada estabilidade e absorção intradérmica foi utilizado o creme Lanette.

Base dermatológica composta principalmente pelo álcool cetosteárfílico e cetosteáril sulfato de sódio, associados aos conservantes butil-hidroxitolueno (BHT) e hidroxibenzoato de propil (Nipazol). A composição final do creme ocorreu com o acréscimo de 20% dos extratos de própolis e geoprópolis (SILVA et al., 2016), conforme estabelecido para cada tratamento.

Desenho experimental

Foram utilizados 20 animais divididos aleatoriamente entre cinco (5) tratamentos, a saber:

- Grupo tratado com formulação contendo 20% de extrato de própolis verde de abelha melífera africanizada (EHPv, n = 4);
- Grupo tratado com formulação contendo 20% de extrato de geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can, n = 4);
- Grupo tratado com formulação contendo 20% de extrato de geoprópolis de abelha jandaíra (EHG-Jan, n = 4);
- Grupo tratado com formulação de mercado composta por Dexametasona, Neomicina, Bacitracina, Griseofulvina, Benzocaína (Crema 6^a ®, Labayes) e Ciclosporina A 6mg/kg/dia (Immunoc®, Santgar) - controle positivo (GC+, n = 4);
- Grupo submetido à aplicação apenas do creme base sem princípio ativo - controle negativo (GC-, n = 4).

Avaliação clínica

O acompanhamento dos transplantes foi realizado visualmente pelo menos uma (1) vez ao dia para verificar a evolução da aceitação dos retalhos transplantados, assim como a avaliação do comportamento dos animais.

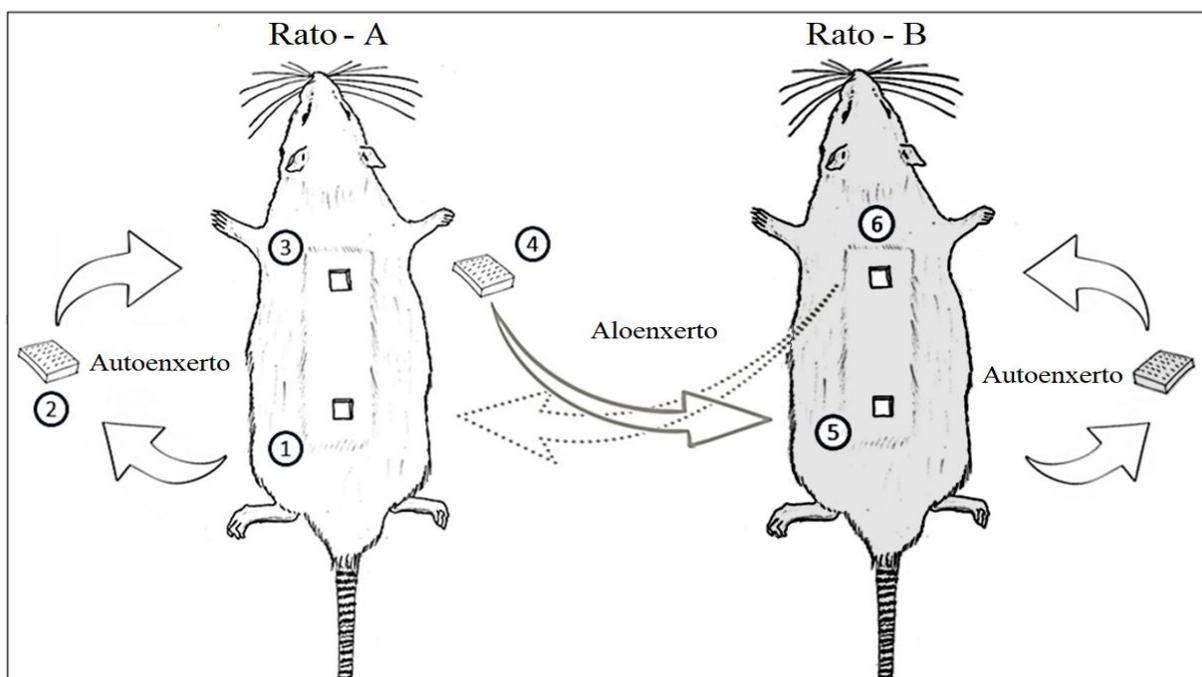
Anestesia

Os animais foram anestesiados utilizando anestesia dissociativa com cloridrato de xilazina (10mg. Kg-1) e cloridrato de cetamina (75 mg. Kg-1) via intraperitoneal. Constatado o plano anestésico adequado, foi procedida a tricotomia e antissepsia do local cirúrgico com iodopovidona a 10%.

Transplante autólogo

Para facilitar a padronização das dimensões cirúrgicas dos enxertos, foi utilizado gabarito marcador. Conforme representado na Figura 1, o autotransplante (autoenxerto) foi realizado com a formação inicial de duas feridas quadradas com um (1) centímetro de arestas, ambas de iguais dimensões, sendo obtido o leito receptor cranial (Fig.1-3) situado no dorso do tórax (CHAVES et al., 2008), e o leito receptor caudal (Fig.1-1) situado na região dorso-lombar. Em seguida, o fragmento de pele caudal foi transferido, no mesmo animal, para o leito receptor cranial. Para retardar a rejeição dos transplantes no GC+, os enxertos foram tratados topicamente com ciclosporina e creme com dexametasona, neomicina e bacitracina (Crema 6A/LABYES).

Figura 1 – Esquema experimental de troca de enxertos em ratos Wistar tratados com extrato hidroalcoólico de própolis e geoprópolis.



Legenda: (1) local de retirada do enxerto cutâneo caudal para o autotransplante do rato A; (2) obtenção de enxerto quadrado de 1 cm de lados, mantido os anexos: epiderme e derme. (3) ferida cutânea cranial criada para receber o enxerto do autoenxerto do rato A. (4) O fragmento cutâneo cranial destinado ao outro animal, o rato B. (5) ferida cutânea caudal do rato B destinada a receber o enxerto da ferida cranial do rato A. (6) enxerto cranial do rato B a ser destinado ao leito receptor caudal do animal A.

Transplante alogênico

O transplante alogênico ocorreu com o traslado do enxerto do leito cranial (de cada animal) para o leito receptor caudal de outro animal geneticamente diferente. Para retardar a

rejeição dos transplantes no grupo controle positivo, os enxertos foram tratados por via tópica com ciclosporina e creme com dexametasona, neomicina e bacitracina (Crema 6A/LABYES). Todos os enxertos (autólogos e alogênicos) foram fixados no leito com pontos simples (fio mononylon 4-0), totalizando oito (8) pontos (um em cada vértice e um no centro de cada aresta). Conforme técnica de Vendramin et al. (2001), respeitou-se uma distância mínima de quatro (4) cm entre os retalhos com a finalidade de se evitar quaisquer interações biológicas.

Hematologia e bioquímica sérica

Foi coletado, por venopunção das veias laterais da cauda, 1,0 ml de sangue de cada animal. Posteriormente, foi acondicionado em tubos estéreis contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e destinados à realização de eritrograma e leucograma, segundo metodologia descrita por Ferreira Neto et al. (1981).

Após análise hematológica, as amostras de sangue foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos e o plasma obtido foi submetido à análise bioquímica, sendo mensurados os seguintes parâmetros: Proteína total, Proteína Plasmática Total (PPT), Albumina, Globulina, Ureia, Creatinina, Aspartato Aminotransferase (AST), Colesterol, Triglicérides. Todos os parâmetros analisados neste trabalho foram feitos utilizando-se analisador bioquímico semiautomático modelo BIO-200[®], por meio de técnicas enzimáticas e colorimétricas, utilizando kits comerciais. Foram observadas todas as especificações dos fabricantes (curva de calibração e teste), assim como também foram feitas duplicatas.

Avaliação histopatológica do tecido cutâneo

Para a avaliação da influência do produto na integração celular dos enxertos cutâneos, foi feita uma biópsia da borda no 15º dia pós-operatório, cortando-se borda normal e borda enxertada. Os fragmentos foram fixados em solução formolizada 10% por 48 h, posteriormente desidratados em álcool e diafanizados em xilol, submetidos à inclusão em parafina, cortados a 5µm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (HE).

As análises foram realizadas por avaliador único utilizando microscópio Nikon[®] Eclipse E200. Foram analisados os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório de fase aguda e crônica, necrose isquêmica, reação gigantocelular, proliferação fibroblástica, colagenização, reepitelização e neoformação capilar (REIS FILHO et al., 2017).

Análise dos dados

Os dados de contagem e mensurações foram reunidos organizados em planilha eletrônica (Excel), posteriormente, foi trabalhada estatística descritiva em média, desvio-padrão e porcentagem. Em seguida, procedeu-se a análise de pressupostos para verificação de normalidade e homocedasticidade. Constatada a distribuição não gaussiana dos dados, procedeu-se a aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* Dunn 5%. Para comparação dos dados de contagem foi aplicado o teste de Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% de probabilidade ($p < 0,05$). O software estatístico utilizado foi o BioEstat v.5.0.

Resultados

Os animais se recuperaram espontaneamente da anestesia dissociativa, posteriormente apresentaram satisfatória recuperação cirúrgica. A evolução pós-operatória ocorreu sem registro de intercorrências.

Na análise físico-química das própolis e geoprópolis utilizadas nesse experimento (Tabela 1), constatou-se que as amostras apresentaram-se ligeiramente ácidas (4,38 a 5,93), sendo a do grupo EHG-Jan a mais ácida entre elas (pH 4,4). Em relação à condutividade elétrica, os valores encontram-se na faixa de 40,25 a 60,48 uS/cm. A amostra de EHG-Jan foi a que apresentou maior ($p < 0,05$) quantidade de compostos fenólicos, sendo o mesmo observado para o teor de flavonoides totais. No entanto, a maior atividade antioxidante foi observada no extrato EHG-Can, cuja amostra é composta de geoprópolis obtida da abelha canudo (*Scaptotrigona sp.*).

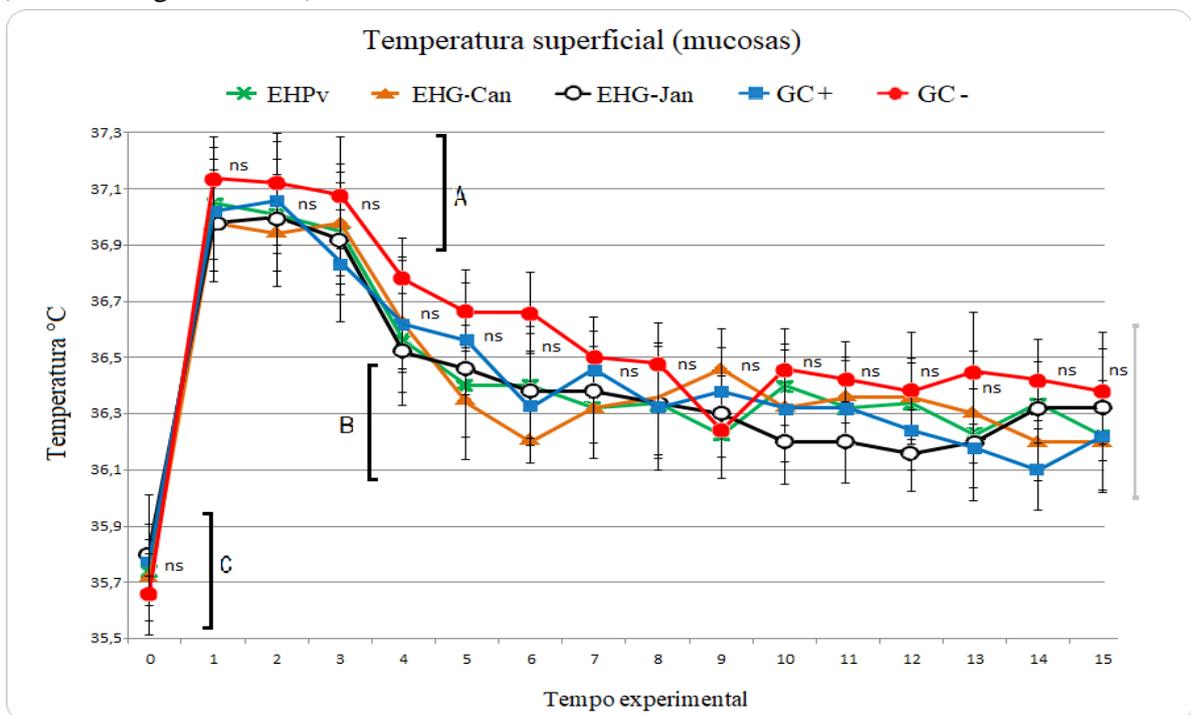
Tabela 1 – Média \pm desvio padrão dos dados da análise físico-química dos extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can) e geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), média seguida dos respectivos desvios-padrão.

Análises	Unidade	EHPv	EHG-Can	EHG-Jan
Potencial hidrogênio iônico	- *	5,91 \pm 0,02 ^a	5,6 \pm 0,01 ^a	4,4 \pm 0,02 ^b
Condutividade Elétrica	(uS/cm)	49,20 \pm 0,01 ^a	60,45 \pm 0,03 ^a	40,26 \pm 0,01 ^a
Fenóis Totais	mg EAG/100mL	401,93 \pm 3,3 ^{ab}	291,77 \pm 0,74 ^b	992,55 \pm 5,52 ^a
Flavonoides Totais	mg EAG/100mL	93,72 \pm 0,27 ^b	7,84 \pm 0,27 ^c	331,65 \pm 0,54 ^a
Atividade antioxidante	IC50 uL/mL	25,70 \pm 0,1 ^b	42,32 \pm 1,3 ^a	16,63 \pm 0,05 ^c

Legenda: ^{abc} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). * Adimensional

Em relação à temperatura superficial da mucosa dos animais (Figura 2), observa-se um início com redução considerável ($p < 0,05$) da temperatura no momento pós-cirúrgico em relação ao dia 1, 24 horas após a cirurgia. É possível notar que no primeiro, segundo e terceiro dia experimental os animais apresentaram temperatura mais elevada ($p < 0,05$) quando comparada ao momento inicial e a médias frequentes ao final do estudo. Nos demais dias, os ratos apresentaram temperatura superficial de mucosas estatisticamente similares ($p > 0,05$).

Figura 2 – Média \pm desvio padrão da temperatura superficial das mucosas de ratos wistar submetidos a transplante cutâneo, autogênico e alogênico, tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).

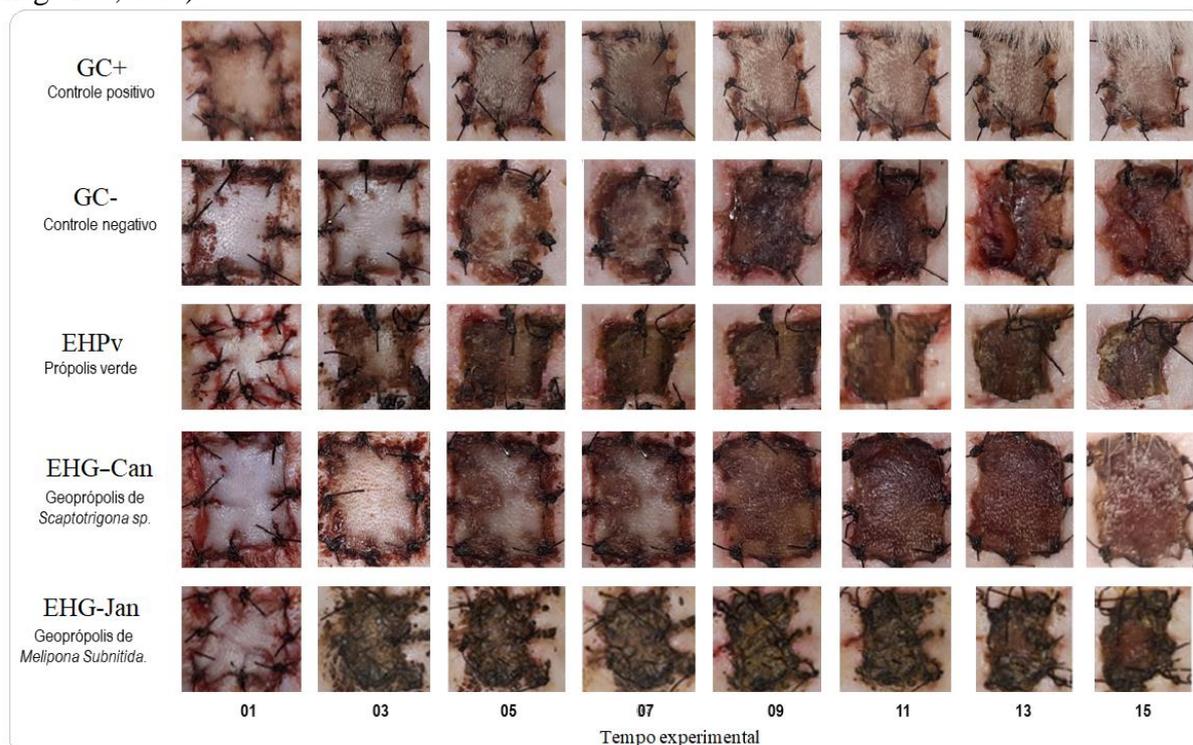


Legenda: ^{abc} Letras minúsculas diferentes alinhadas verticalmente no mesmo dia indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
^{ABC} Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) no segmento de temperatura.
 ns Não significativo entre todos os grupos analisados no mesmo dia.

Na avaliação macroscópica dos transplantes autogênicos (Figura 3), os tecidos do grupo GC+ apresentaram o melhor aspecto e coloração ao longo do período experimental, com escurecimento discreto e gradual, contração do enxerto e linha de junção com sinais de cicatrização, sugerindo rejeição lenta. Em contradição, foi observado no GC- a pior evolução pós-transplante, com desvitalização considerável após o nono dia de experimento, presença de tecido friável e manutenção de edema e rubor nas bordas do leito receptor até o dia de retirada. O sentido das alterações degenerativas no epitélio cutâneo foi igualmente distribuído,

concomitantemente centro e borda do enxerto. No grupo EHPv foi observado discreto escurecimento dos tecidos transplantados, similar ao GC+ até o terceiro dia, contudo progrediu de maneira gradual, além disso, o tecido se manteve seco e com resistência mecânica. Verificou-se, também, a progressão de escurecimento borda-centro no grupo EHPv. No grupo EHG-Can os tecidos apresentaram boa coloração até o terceiro dia, como visto no grupo CG+, também houve escurecimento após o terceiro dia, com orientação borda-centro tecidual, coloração menos acentuada e tecido mais firme. Destaca-se, também, a presença de ilhas de tecido viável até o nono dia experimental. Os tecidos tratados com EHG-Jan apresentaram aspecto diferenciado, pois a geoprópolis criou também uma película escurecida, seca, semelhante a uma tintura resistente a lavagem. Numa abordagem comparativa, os tecidos dos grupos EHPv, EHG-Can e EHG-Jan apresentaram boa integração nas bordas, com resistência, aspecto seco e sem odores de modo similar ao GC+.

Figura 3 – Aspecto macroscópico dos enxertos cutâneos autogênicos de ratos Wistar tratados com formulação contendo extrato de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).



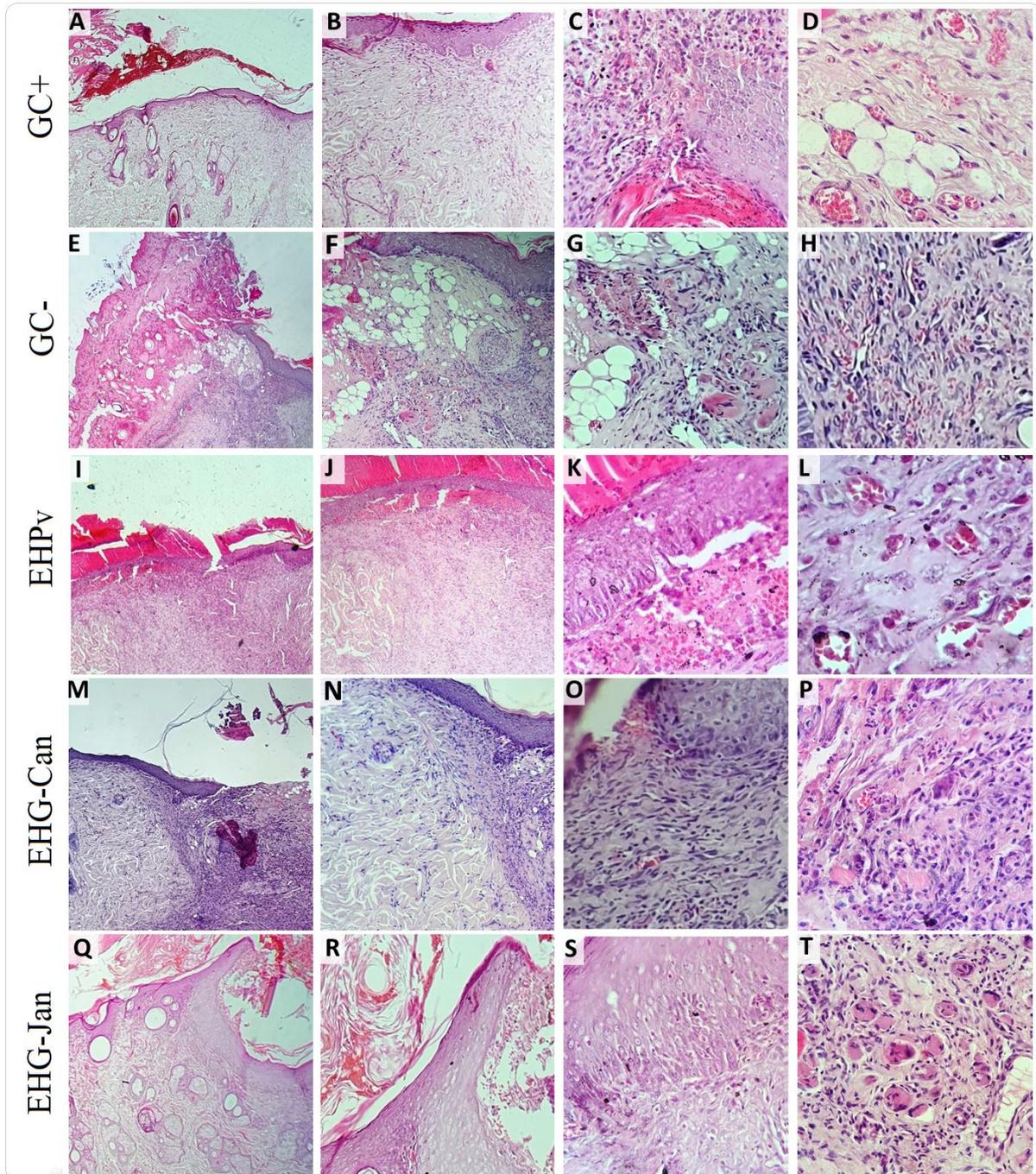
Fonte: Elaborada pelos autores.

Na análise histopatológica dos transplantes autogênicos (Figura 4) observou-se nos tratamentos diferentes estágios de integração tecidual, com neoformação fibrosa em

intensidades diferentes. Nos tecidos analisados do GC+, houve reepitelização em estágio avançado, presença de fibroblastos, numerosos capilares bem definidos com diâmetro de luz variável. Na análise microscópica do GC-, os transplantes apresentaram crosta espessa, vacuolizada, evidente desvitalização, área de junção epidermal pouco definida, considerável infiltrado inflamatório e numerosos vasos de mínimo calibre. Tratando-se do grupo EHPv, foi observada a formação de crosta degenerada mais externamente, contudo houve avançada reepitelização (incompleta) e presença de infiltrado leucocitário com numerosos vasos. No grupo EHG-Can foi percebido área de integração, moderado número de fibroblastos com poucos capilares presentes nos tecidos transplantados. Já no grupo EHG-Jan foi observada presença de crosta, assim como área de transição com epitélio proliferado (reepitelização completa) e poucos vasos sanguíneos.

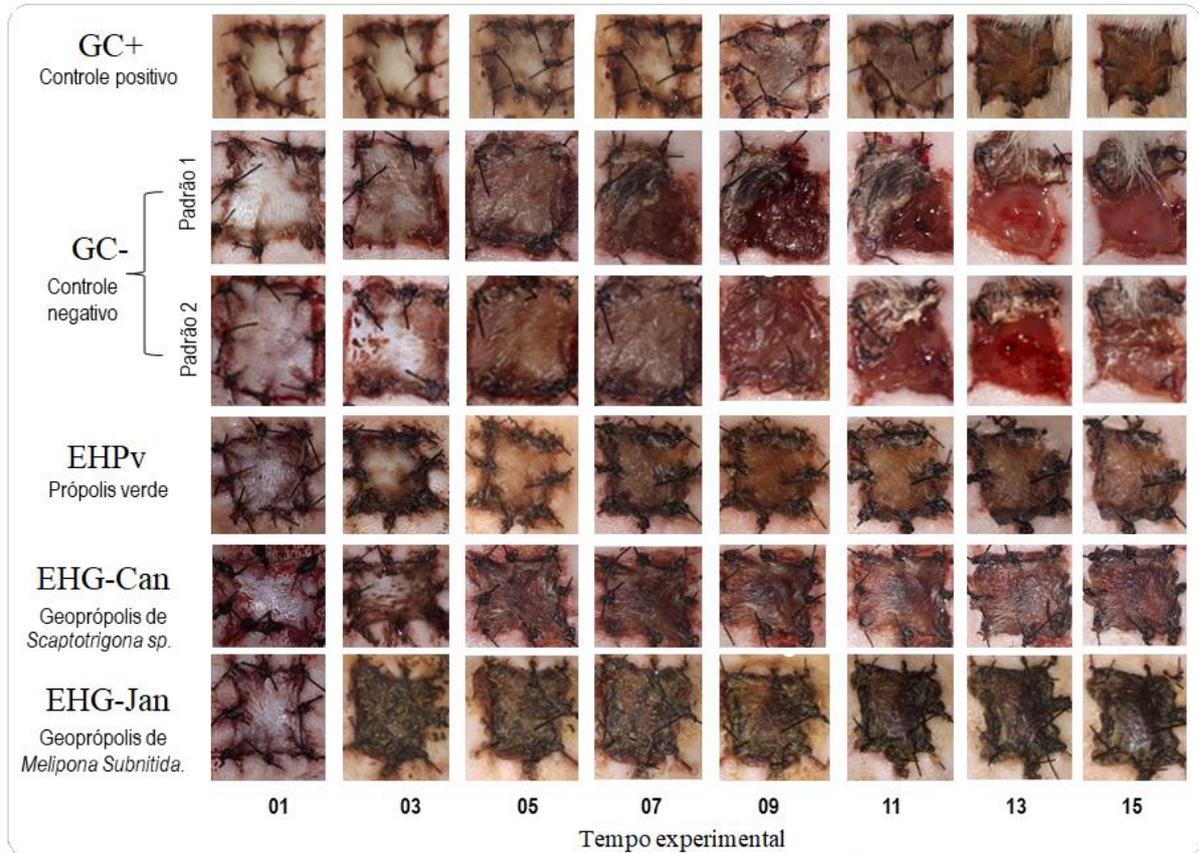
Sobre o acompanhamento macroscópico dos alotransplantes (Figura 5), os enxertos do GC+ apresentaram aspecto satisfatório à inspeção, com escurecimento lento e gradual, contudo ao comparar o GC+ do autoenxerto e GC+ desta análise é perceptível escurecimento mais acentuado a partir do nono dia. Os transplantes de todos os animais do grupo GC- apresentaram o pior aspecto externamente, adicionalmente, notou-se dois padrões distintos ao final do experimento: no padrão 1 parte da área transplantada apresentou-se aberta, com percentual elevado de tecido descolado da ferida; e o padrão 2, no qual a área transplantada despreendeu-se totalmente do leito (rejeição hiperaguda) e apresentou uma fina membrana de tecido cicatricial após a expulsão do tecido imunogênico. Em ambos os padrões ocorreu sinais de desvitalização progressiva no terceiro dia (entre 30 e 48 horas) e necrose acentuada no sétimo dia experimental. Os transplantes do grupo EHPv apresentaram escurecimento relativamente mais rápido que o grupo GC+ (em uma semana), mas com bordas em qualidade similar ao controle positivo. Já os do grupo EHG-Can apresentaram escurecimento rápido (em cinco dias), boa aderência na interseção das bordas e sutil distensão na área enxertada. No grupo EHG-Jan os transplantes apresentaram um aspecto diferenciado, pois a geoprópolis criou também uma película escurecida, seca, semelhante a uma tintura resistente a lavagem. Essa coloração própria dificultou a observação do tecido, porém apresentou uma firme junção tecido normal-enxerto.

Figura 4 – Fotomicrografia de tecidos cutâneos de ratos Wistar autotransplantados e tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).



A - Presença de crosta (topo) e área transição (direita) (4x). B - Presença moderada de fibroblastos, colágeno e pequenos vasos sanguíneos (10x). C - Discreto infiltrado leucocitário e fibroblastos (esquerda) e células de reepitelização (direita) (40x). D - Numerosos vasos de diferentes calibres (40x). E - Área de junção epidermal com enxerto desvitalizado e não integrado (ao centro) (4x). F - Presença de enxerto degenerado (à esquerda) e presença de considerável infiltrado inflamatório (abaixo) (10x). G - Infiltrado inflamatório (40x). H - Infiltrado leucocitário e numerosos vasos (40x). I - Presença de crosta, área transição (direita) (4x). J - Estágio inicial de reepitelização (10x). K - Presença de leucócitos (40x). L - Discreto infiltrado e numerosos vasos (40x). M - Área transição (ao centro) (4x). N - Moderado número de fibroblastos (10x). O - Presença de fibroblastos (40x). P - Poucos vasos (40x). Q - Área de transição (4x). R - Avançada reepitelização (10x). S - Presença de fibroblastos (40x). T - Moderada quantidade de fibroblastos, poucos vasos (40x). Coloração: HE.

Figura 5 – Aspecto macroscópico dos enxertos cutâneos alogênicos de ratos Wistar tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).



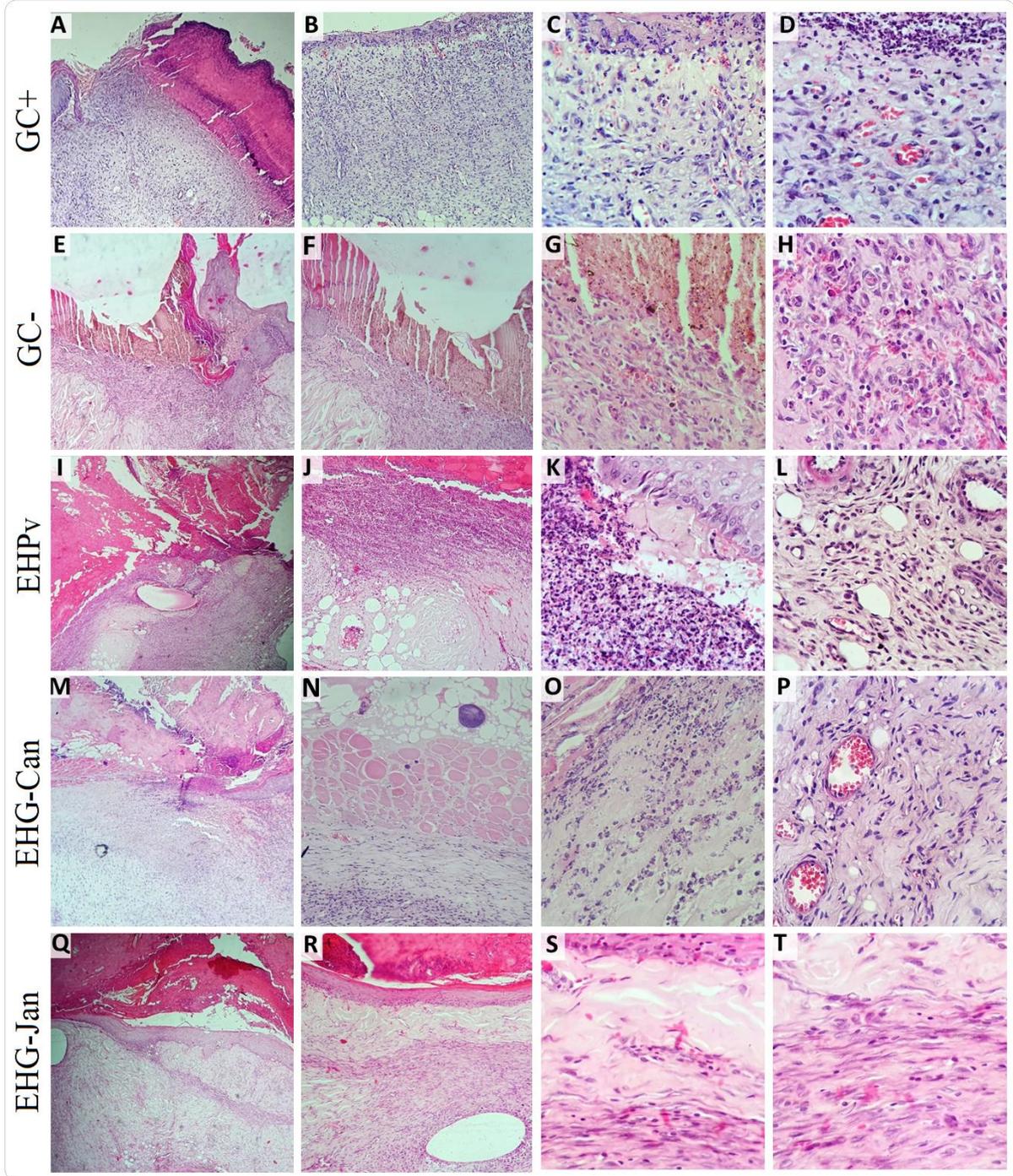
Fonte: Elaborada pelos autores.

Na análise histopatológica dos enxertos cutâneos alogênicos (Figura 6) observaram-se diferentes graus de desvitalização, assim como, evidente reepitelização em diferentes estágios. Sobre o GC+, foi observado retardo no reconhecimento dos tecidos transplantados e quantidade moderada de infiltrado inflamatório. Observou-se também densidade celular perceptível na derme e hipoderme, integração epidérmica parcial e vitalidade comprometida. Contudo, apresentou capilares bem definidos de calibre variável. Sobre o GC-, foi percebido que nos leitos com total desvitalização e desprendimento do fragmento transplantado houve um processo de reparo tecidual comum a uma cicatrização de ferida aberta. Já no padrão de perda quase que total dos retalhos observou-se a presença de crosta necrosada e, logo abaixo, início de migração de células epiteliais da região normal por hiperproliferação, assim como acentuado infiltrado inflamatório com presença de células fagocitárias, além disso, também foi detectado vasos de pequeno calibre. Tratando-se do grupo EHPv, os tecidos apresentaram crosta espessa, região epidermal com acentuado infiltrado inflamatório misto, densidade

celular perceptível na derme e hipoderme, assim como discreta quantidade de vasos sanguíneos. Sobre o grupo EHG-Can, percebeu-se processo de reepitelização ocorreu com retardo, além disso, observou-se infiltrado de células fagocíticas e numerosos fibroblastos, e alguns vasos sanguíneos (calibrosos). A respeito do grupo EHG-Jan, percebeu-se uma extensa e espessa crosta nos transplantes, além disso, houve reepitelização avançada com numerosos fibroblastos e presença de poucos vasos sanguíneos.

A respeito das alterações hematológicas (Tabela 2), as médias em cada parâmetro do eritrograma não foram afetadas de modo significativo ($p > 0,05$) pelos tratamentos. Sobre o eritrograma, percebe-se que os valores de contagem de células vermelhas (RBC) apresentaram-se no limite superior da literatura consultada com pelo menos um animal superando o teto (GC+, EHPv e EHG-Can). Este padrão de proximidade com os limites também foi verificado no hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (MCV), contudo, a concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC) apresentou-se integralmente dentro dos limites para todos os animais. A respeito do leucograma, foi registrado considerável aumento de leucócitos totais dos animais do grupo GC-, demonstrando provável combate a uma injúria contaminada. Os animais dos grupos GC- e EHPv apresentaram diferença ($p < 0,05$) na quantidade de neutrófilos quando comparado aos outros tratamentos. Em todos os grupos o número de monócitos apresentou acima do limite superior dos autores consultados (LIMA et al., 2014; BRANCO et al., 2011; MELO et al., 2012; DA SILVA et al., 2015; GRASSI et al., 2011; BARBOSA et al., 2010; HARKNESS; WAGNER, 1993).

Figura 6 – Fotomicrografia dos tecidos cutâneos de ratos Wistar alotransplantados e tratados com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial com dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).



A - Área de transição do enxerto GC+ com razoável reepitelização (4x). B - Presença de fibroblastos GC+ (10x). C - Moderada presença de fagócitos e fibroblastos (40x). D - Vaso com grande luz vascular (40x). E - Fina crosta desvitalizada (topo) (4x). F - Presença de acentuado infiltrado inflamatório subepidérmico (10x). G - Presença de fagócitos (40x). H - Infiltrado inflamatório e numerosos vasos (40x). I - Extensa e espessa crosta desvitalizada (topo) (4x). J - Acentuado infiltrado inflamatório e linfocitário (topo) (10x). K - Infiltrado com processo inflamatório misto (40x). L - Discreta quantidade de vasos (40x). M - Extensa e espessa crosta (topo) (4x). N - Processo de reepitelização em estágio atrasado (10x). O - Presença de fagócitos e fibroblastos (40x). P - Poucos vasos, porém calibrosos (40x). Q - Extensa e espessa crosta (topo) (4x). R - reepitelização e numerosos fibroblastos (abaixo) (10x). S - Presença de fibroblastos (40x). T - Pouca quantidade de vasos (40x).

Tabela 2 – Valores (média ± desvios) hematológicos de ratos Wistar tratados por via tópica com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial contendo dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).

Parâmetro	GC+	GC-	EHPv	EHG-Can	EHG-Jan	REF.*
Eritrograma						
RBC (10 ⁶ /mm ³)	11,0 ±0,9 ^a	9,0±1,4 ^a	11,0±0,4 ^a	10,6±0,2 ^a	7,1±0,3 ^a	6,2-10,0
Hematócrito (%)	46,7±3,8 ^a	46,3±3,5 ^a	47,8±1,8 ^a	46,7±2,5 ^a	39,0±1,4 ^a	34,0-47,8
Hemoglobina (g/dL)	12,1±0,2 ^a	10,9±1,1 ^a	12,0±0,4 ^a	12,0±0,5 ^a	10,6±0,4 ^a	11,0-16,4
MCV (fL)	43,3±3,7 ^a	51,7±4,3 ^a	43,4±1,6 ^a	44,1±2,3 ^a	53,3±1,9 ^a	45,0-54,0
MCHC (%)	24,9±1,8 ^a	23,5±1,5 ^a	24,1±0,9 ^a	25,7±0,6 ^a	26,5±1,0 ^a	26,0-35,0
Leucograma						
Leucócitos (tot.) (/mm ³)	6350±626 ^b	16733±583 ^a	6087±1325 ^b	8100±2707 ^b	9165±332 ^b	5260-10000
Eosinófilos (%)	1,0±0,0 ^a	2,0±1,0 ^a	2,0±1,0 ^a	1,3 ±0,6 ^a	1,5±0,6 ^a	0,16-2,34
Monócitos (%)	11,7±2,3 ^a	12, 3±5,7 ^a	11,7±2,1 ^a	11,0 ±6,2 ^a	12,1±5,3 ^a	1,0 -8,79
Linfócitos (%)	28,7±11,0 ^a	41,0±4,6 ^a	34,0±4,6 ^a	37,0±16,7 ^a	37,7±5,1 ^a	43-78,6
Basófilos (%)	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0±0,0 ^a	0,0-1,66
Neutrófilos (seg.) (%)	21,0±9,9 ^{ab}	31,0±8,9 ^a	29,0±9,5 ^{ab}	29,3±8,0 ^{ab}	15,8±5,5 ^b	9,0-34,0
Bastonetes (%)	0,7±0,5 ^a	2,7±0,6 ^a	1,3±1,2 ^a	1,0±0,0 ^a	0,5±0,3 ^a	0,0-1,0
Plaquetograma						
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	897±62 ^a	764±252 ^a	876±31 ^a	811±45 ^a	705±38 ^a	780-1149

abc - Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05). RCB = Contagem de Eritrócitos; MCV = Volume Corpuscular Médio; MCHC = Concentração de hemoglobina corpuscular médio. *Valores de referências de acordo com faixas mínima e máxima de: LIMA et al., 2014;BRANCO et al., 2011; MELO et al., 2012; DA SILVA et al., 2015; GRASSI et al., 2011; BARBOSA et al., 2010; HARKNESS; WAGNER, 1993.

Sobre os dados bioquímicos (Tabela 3) percebe-se que os valores não foram afetados na sua totalidade de modo significativo (p>0,05) pelos tratamentos. Foi verificado que alguns parâmetros avaliados variaram muito dentro do mesmo grupo. Os valores de proteína total, globulina, ureia, creatinina e a aspartato aminotransferase (AST) foram semelhantes aos observados na da literatura. Já em relação aos valores de proteína plasmática total, albumina, colesterol e triglicérides, pelo menos um animal de cada grupo apresentou uma média fora dos limites de referência.

Tabela 3 – Valores (média ± desvios) bioquímicos séricos de ratos Wistar tratados por via tópica com extratos de própolis verde (EHPv), geoprópolis de abelha canudo (EHG-Can), geoprópolis de jandaíra (EHG-Jan), formulação comercial contendo dexametasona e ciclosporina (controle positivo, GC+) e apenas creme base sem princípio ativo (controle negativo, GC-).

Parâmetro	GC +	GC -	EHPv	EHG-Can	EHG-Jan	REF.*
Proteína total (g/dL)	5,8±0,1 ^a	5,6±0,5 ^a	4,8±0,1 ^a	5,3±0,5 ^a	5,0 ±0,3 ^a	4,1-6,6
PPT(g/dL)	7,9±0,8 ^a	7,5±0,6 ^a	6,8±0,2 ^a	7,3±0,4 ^a	6,4 ±0,6 ^a	6,3-7,4
Albumina(g/dL)	3,9±1,3 ^a	3,6±0,4 ^a	3,9±0,3 ^a	3,7±0,9 ^a	3,1 ±0,7 ^a	3,0-3,6
Globulina(g/dL)	1,9±1,3 ^a	2,0±0,1 ^a	0,9±0,3 ^a	1,6±0,9 ^a	2,0 ±0,4 ^a	1,3-3,5
Ureia(mg/dL)	59,0±2,6 ^a	49,0±7,5 ^a	53,7±2,9 ^a	60,7±4,5 ^a	59,3±1,5 ^a	33-61
Creatinina(mg/dL)	0,8±0,1 ^a	0,8±0,2 ^a	0,8±0,2 ^a	0,8±0,0 ^a	0,7 ±0,1 ^a	0,24-0,82
AST(U/L)	157,2±53,8 ^a	136,8±42,9 ^a	108,3±3,0 ^a	129,8±4,4 ^a	183,3±67,4 ^a	87-210
Colesterol(mg/dL)	119,0±19,0 ^a	91,0 ±12,2 ^a	85,7±19,7 ^a	98,7±18,6 ^a	94,7±23,4 ^a	63-100
Triglicérides(mg/dL)	105,9±38,8 ^a	115,0±76,1 ^a	88,6±30,2 ^a	63,0±17,1 ^a	69,3±7,9 ^a	42-100

abc - Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$). PPT = proteína plasmática total; AST = aspartato aminotransferase. *Valores de referências de acordo com faixas mínima e máxima de: LIMA et al., 2014; BRANCO et al., 2011; MELO et al., 2012; DA SILVA et al., 2015; GRASSI et al., 2011; BARBOSA et al., 2010; HARKNESS; WAGNER, 1993.

Discussão

A experimentação com animais inicialmente hígidos permitiu a observação de quadro clínico mais favorável e dentro de uma faixa menos discrepante (PERDIGÃO et al., 2015). Portanto, a boa recuperação anestésica assim como a ausência de comportamento atípico estava dentro da expectativa experimental.

O acompanhamento do pH permite notar a ocorrência de falhas no processamento, na caracterização do produto de origem e no processo de extração, pois auxilia na seleção e determinação das substâncias a serem extraídas segundo sua polaridade e química (LONGHINI et al., 2007). A faixa de pH da própolis varia de 3,0 a 5,7, tendendo a apresentar um caráter ligeiramente ácido (SATO, 2003), contudo, apenas as amostras das abelhas indígenas foram concordantes com essa faixa. No caso do extrato de própolis verde, apresentou-se dentro do padrão característico de uma própolis natural (GONSALES et al., 2005). A condutividade elétrica também é outro indicador de má qualidade, adulteração e até de rastreamento de origem (AGANIN, 1971; SODRÉ, 2005). Comumente esse aspecto não é analisado, no entanto, os dados obtidos nesse trabalho podem ser utilizados como base comparativa na caracterização dos extratos e indicador de qualidade.

O tratamento EHG-Jan apresentou uma considerável quantidade de fenóis totais, isso pode configurar um diferencial desse material resinoso, e essa peculiaridade está em acordo com De Souza et al. (2015), que destacaram que o valor encontrado para o extrato de geoprópolis de *Melipona subnitida* do Alto Oeste Potiguar (RN) estava bem acima do preconizado na normativa do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001) e que estava igual ou superior à amostra de própolis de abelha melífera. Contudo, os resultados não seguiram proporcionalidade de benefícios sobre os transplantes alogênicos, mesmo apresentando resultados promissores nos autólogos. A respeito dos flavonoides, o tratamento EHG-Jan apresentou o maior quantitativo. A esse agrupamento de compostos são atribuídos muitos efeitos biológicos, como atividade antiviral, antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória e antioxidante na própolis principalmente quando associados aos fenóis (UZEL et al., 2005; VOLPI; BERGONZINI, 2006; LUSTOSA et al., 2008, FROZZA et al., 2013). Ainda sobre os flavonoides, o grupo submetido aos efeitos do EHG-Can foi similar ao EHG-Jan, porém com quantidade proporcional de apenas 3%. Isso sugere que a qualidade (presença de compostos específicos) e as interações sinérgicas com outros componentes químicos podem ser mais relevantes que a quantidade. A atividade antioxidante tanto na própolis como na geoprópolis guarda relação com os flavonoides, uma vez que muitos são efetivos nessa atividade (AHN et al., 2007). É válido destacar que não somente os flavonoides desempenham essa característica, os compostos fenólicos também são copartícipes (MANI et al., 2006; VICENTINO; MENEZES, 2007). Contudo, o EHG-Can apresentou considerável poder antioxidante contendo pouco flavonoide e fenóis totais.

Sobre a influência biológica dos extratos sobre a temperatura corporal, não foi percebido nenhuma alteração, nem correlação promovida pelos tratamentos estudados. Muito embora alguns autores tenham levantado indícios que os incas usavam a própolis para combater a febre (CASTALDO; CAPASSO, 2002; SFORCIN; BANKOVA, 2011), os resultados observados neste trabalho não expressaram discrepância de modo notável do grupo GC- para refutar ou corroborar. O que pode elucidar a igualdade estatística com GC-, este previamente ineficaz na prevenção da febre, provavelmente é a associação da via de aplicação (tópica) com a variação individual no momento da aferição, assim como a mínima contaminação inicial e dimensão reduzida da lesão.

Um dos maiores problemas enfrentados na utilização de transplantes de órgão ou tecidos é a predisposição do organismo para rejeitar (FISHER et al., 2008), isso se deve ao rigoroso controle do que é próprio e o que não é próprio (*self/non self*). Os resultados mais

favoráveis dos transplantes autogênicos se devem ao doador e receptor possuírem os mesmo marcadores na superfície celular (MHC-I e MHC-II), essa plena igualdade permite o reconhecimento dos tecidos pelas células de defesa como próprias. No presente trabalho também foram encontrados os melhores resultados nos animais submetidos ao transplante autogênico. Esse desempenho favorável se deve a forma de reparo, no caso de autoenxerto, o fragmento transplantado sofre um processo de cicatrização dividido em duas etapas, integração e contração (LOFÊGO FILHO et al., 2006). A integração e reepitelização observadas neste trabalho não foram melhores devido à impossibilidade de realização da anastomose vascular entre tecido transplantado e sítio receptor (retalho), posto que as dimensões diminutas dos vasos superficiais em ratos. Ainda assim, foi possível observar (macro e microscopicamente) maior integração nas bordas, provavelmente devido maior uniformidade entre leito e enxerto e melhor difusão por causa da espessura (CHAVES et al., 2008). É possível supor que angiogênese proporcionada pelos vasos funcionais do leito receptor também tenha contribuído na região de aposição das bordas.

Os animais do grupo EHPv apresentaram escurecimento do enxerto mais rápido que os do grupo EHG-Can. Esse escurecimento provavelmente foi induzido tanto pelas isoflavonas presentes na própolis (FROZZA, 2016), como por um composto fenólico chamado de Artepillin C (ácido 3-(4-hidroxi-3,5-di(3-metil-2-buten-1-il)fenil)-2-(E)-propenóico) (KIMOTO et al., 1996; KIMOTO et al., 1998), já que ambos são indutores de apoptose de células danificadas. Como a EHG-Can apresentou em sua composição menos compostos fenólicos e flavonoides, provavelmente apresentou menor atividade apoptótica.

Segundo Takiishi (2008) os enxertos alogênicos sofrem maior influência dos eventos inflamatórios, primeiramente pela injúria cirúrgica e, em seguida, exacerbada pela incompatibilidade de reconhecimento imunológico do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH/MHC). O transplante de pele é mais propenso à rejeição por modo causal pouco conhecida, mas as células de Langerhans pode ter papel crucial na maior ativação dos linfócitos (HORNER et al., 2008), além da atuação de queratinócitos que participam liberando mediadores quimiotáticos (KUPIEC-WEGLINSKI, 1997). Dessa maneira, torna-se obrigatório o uso de imunossuppressores para obter maior sobrevida do enxerto como, por exemplo, a Ciclosporina (BOTTINI et al., 1998).

Ainda sobre os transplantes alogênicos, o uso de Ciclosporina associada à dexametasona no grupo controle positivo (GC+) permitiu evidente sobrevida e qualidade do tecido enxertado. No entanto, os resultados observados poderiam ser melhores com o aumento

da dosagem do fármaco por ser possível alcançar uma maior imunossupressão uma vez que a dosagem utilizada nesse experimento ter sido menor do que a utilizada por outros autores em trabalhos semelhantes (10mg/kg/dia, VON HERTWIG et al., 1999). Optou-se por essa menor dosagem do fármaco para evitar efeitos colaterais sistêmicos, como lesões nos néfrons, reduzindo assim a interferência na saúde geral dos animais (GARCIA et al., 2004). A respeito da sobrevivência dos demais enxertos, os exames clínicos e histológicos permitiram avaliar que houve rejeição em velocidade e intensidade bem variáveis. É importante frisar que as formulações com 20% de extrato não impediram o processo de rejeição, contudo atenuaram os eventos de citólise, provavelmente, pela ação anti-inflamatória frente à injúria cirúrgica e, possivelmente, pela proteção da área contra contaminação pela atividade antimicrobiana dos extratos (HERMETO; DE ROSSI, 2012; DE OLIVEIRA; FARIA, 2019). Sobre a classificação, os grupos EHPv, EHG-Can e EHG-Jan apresentaram indícios de rejeição aguda, porém com evolução lenta quando comparados a desvitalização do grupo controle negativo.

Não foi possível precisar a intensidade da rejeição, para fins de classificação, por que todos os fragmentos histopatológicos oriundo dos enxertos foram obtidos na fase de necrose (total no controle negativo). Essa limitação também foi encontrada por Chaves et al. (2008) quando trabalharam com alotransplantes em coelhos. Para os autores isso poderia ser contornado com grupos adicionais para acompanhar as fases inflamatórias, ainda acrescentaram que a fibrose dérmica e o espessamento de camada íntima dos vasos arteriais não estavam suficientemente diferentes para a caracterização (CHAVES et al., 2008).

Os dados hematológicos e bioquímicos obtidos nesse experimento variaram em relação ao mínimo e máximo encontrado na literatura (LIMA et al., 2014; BRANCO et al., 2011; MELO et al., 2012; DA SILVA et al., 2015; GRASSI et al., 2011; BARBOSA et al., 2010; HARKNESS; WAGNER, 1993). Para Lima et al. (2014), em levantamento com animais de biotérios, repercutiram que os valores na literatura consultada continha muita variação e os resultados obtidos em seu trabalho também não coincidiram com os relatados na literatura. Outro fator que pode influenciar nas análises hematológicas e bioquímicas é a anestesia (CARTANA et al., 2010; DECKARDT et al., 2007). Já foram observados aumentos transitórios dos níveis séricos de ureia e creatinina em ratos (WELLINGTON; MIKAELIAN; SINGER, 2013) e coelho (GIL et al., 2003) após aplicação da associação de xilazina e cetamina. Acrescenta-se ainda que xilazina e cetamina podem alterar também o eritrograma de felinos (DAS; VASANTH 2007). O presente trabalho apresentou animais com valores

distintos (*outliers*) dentro de um mesmo grupo, o que resultou em médias com elevado desvios.

A monocitose em animais é indicativa de presença de lesões persistentes, ou seja, que requisitam a presença de macrófagos (CHILDRESS, 2012), no presente trabalho, a monocitose provavelmente é consequência do tecido alogênico que mantém sua imunogenicidade e recrutamento de monócitos. A leucocitose observada no grupo GC- pode ser resultado da maior dificuldade dos ratos de belarem a contaminação presentes nos leitos. A neutrofilia encontrada na maioria dos animais do grupo GC- coincide com a dificuldade de cicatrização, provavelmente por causa de recontaminação em feridas desprotegidas. Ao analisar os dados hematológicos e da bioquímica sérica pode-se depreender que nenhum parâmetro foi afetado negativamente por ação direta dos extratos, nos permitindo supor que a ação da quantidade administrada limitou-se a área em estudo.

Conclusão

Os extratos hidroalcoólicos de própolis verde, de geoprópolis de abelha canudo e jandaíra retardaram o processo de desvitalização, e mantiveram os enxertos firmes e aderidos aos leitos receptores nos transplantes autogênicos.

Já nos transplantes alogênicos, os extratos induziram discreto retardo no processo de rejeição, e mantiveram os enxertos firmes e aderidos aos leitos receptores.

Os enxertos tratados com o extrato hidroalcoólico de própolis verde apresentaram melhor aspecto macroscópico, os tratados com extrato hidroalcoólico de geoprópolis de abelha EHG-Can exibiram boa vascularização, e o extrato hidroalcoólico de geoprópolis de abelha jandaíra apresentou efeito reepitelizante promissor.

Referências

ABU-SEIDA, Ashraf M. Effect of propolis on experimental cutaneous wound healing in dogs. **Veterinary medicine international**, p1-4, 2015.

AGANIN, A. F. Electrical conductivity of several unifloral honeys. **Trudy Saratovskogo Zootekhnicheskogo Inatituta**, v. 21, p. 137-144, 1971.

AHN, Mok-Ryeon et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.

ARAÚJO, Maria José Abigail Mendes. Geoprópolis de *Melipona fasciculata* SMITH: ações citotóxica, imunomoduladora, antibacteriana e antifúngica. **Repositório UNESP**, Botucatu-SP. p.21-63. 2013.

BARBOSA, Cristiane Moraes et al. Avaliações hematológicas e bioquímicas do uso de diclofenaco de sódio, meloxicam e firocoxibe em ratos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 2, p. 117-124, 2010.

BARBOSA, Maria Helena, et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, 22.3: 318-322. 2009.

BATISTA, Lara Livia Valença et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 6, p. 515-520, 2012

BOTTINI, P. V. et al. Monitoramento dos níveis de ciclosporina em sangue total em transplantes renais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 176-178, 1998.

BRANCO, A. C. S. C. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-14, 2011.

BRASIL. **Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen apícola, Própolis e Extrato de Própolis, Brasília, 2001.

CARTANA, Camila Basso et al. Transfusão de sangue obtido de doadores anestesiados com cetamina e xilazina ou isoflurano em gatos hipovolêmicos. MS Dissertation. **Repositório Universidade Federal de Santa Maria**, p. 71, 2010.

CASTALDO, Stefano; CAPASSO, Francesco. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v.1, p. 1-6, 2002.

CHAVES, Diva Novy Barbosa; ALBERTI, Luiz Ronaldo; PETROIANU, Andy. Estudo comparativo dos efeitos da talidomida, da ciclosporina e do diclofenaco na sobrevida de aloenxertos cutâneos em coelho. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 1, p. 42-47, 2008.

CHILDRESS, Michael O. Hematologic abnormalities in the small animal cancer patient. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 42, n. 1, p. 123-155, 2012.

CONTE, Fernanda Lopes. Ação imunomoduladora da própolis na apresentação antigênica. **Repositório UNESP**, p.23-44, 2017.

DA SILVA, Letícia et al. Perfil hematológico de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) do biotério da universidade luterana do brasil. In: **XV Fórum de Pesquisa Científica e tecnológica (Canoas)**. 2015.

DAS, D. K.; VASANTH, M. S. Haematological and biochemical changes in xylazine and ketamine anaesthesia in lions. **Indian Veterinary Journal**, v. 84, p. 701 - 704, 2007.

DE OLIVEIRA, Gustavo Duarte; DE FARIA, Vanessa Pavesi. Transplante cardíaco em pequenos animais: as expectativas do avanço da impressão de coração 3D para Medicina Veterinária. **PUBVET**, v. 13, p. 127, 2019.

DECKARDT, K. et al. The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1709 -1718, 2007.

DUTRA, R. P.; Nogueira, A. M. C.; Marques, R. R. D. O., Costa, M. C. P.; Ribeiro, M. N. S. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18 n.4, 557-562. 2008.

FERREIRA, Joselena M. et al. Antioxidant activity of a geopropolis from northeast Brazil: chemical characterization and likely botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p.1-6, 2017.

FERREIRA NETO, J. M.; VIANA, E. S.; MAGALHÃES, L. M. Patologia clínica veterinária. Minas Gerais, **Rabelo**. P.79,1981.

FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n.2, p. 247-253, 2008.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p.137-142, 2013.

FROZZA, Caroline Olivieri da Silva. Avaliação dos efeitos antitumorais da própolis vermelha em células humanas in vitro. **Repositório UCS**, 2016.

FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise de própolis. **Food Science and Technology** v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GARCIA, Solange Cristina et al. Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, n.6, p.393-401, 2004.

GRASSI, Patrícia Ceolin et al. Efeito da dieta hipoprotéica, hiperglicídica em ratos na fase de crescimento sobre o perfil metabólico no animal adulto. **Repositório UFMT**. 2011.

GIL, A. G. et al. Effects of the anaesthetic/tranquillizer treatments on selected plasma biochemical parameters in NZW rabbits. **Laboratory Animals**, v. 37, p.155-161, 2003.

HARKNESS J.E; WAGNER J.E. Biologia e clínica de coelhos e roedores. 3 ed. São Paulo. **Editora Roca**, p.238, 1993.

HERMETO, Larissa Corrêa; DEROSI, Rafael. Enxertia cutânea em pequenos animais. **Nucleus Animalium**, v. 4, n. 1, p. 9, 2012.

HORNER BM, RANDOLPH MA, HUANG, BUTLER PE. Skin tolerance: in search of the Holy Grail. Transplant international: **Official Journal of the European Society for Organ Transplantation**, v.21, n.2, p.101-102. 2008.

IKEGAKI, Masaharu, et al. Determinação de qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis. **Repositório UNICAMP**, 2001.

KIMOTO, Tetsuo., et al. Apoptosis of human leukemia cell lines induced by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Biotherapy**, Tokyo, Japan v.12, n.8, p.1135-1142. 1998.

KIMOTO, Tetsuo., et al. Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the Artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy**, Tokyo, Japan v.23, n.13, p.1855-1859. 1996.

KUPIEC-WEGLINSKI JW, COLTO AJ. VAN DE WATER L. Extracellular matrix proteins and their interactions with the cellular repertoire of transplant recipients. **Transplantation proceeding**. v.29, n.20, p.2601-2602, 1997.

LIMA, Cláudio Moreira et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v.10, n.3, p.5-13, 2014.

LOFÊGO FILHO, José Anselmo, et al. Enxertia de pele em oncologia cutânea. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.5, p.465-472, 2006.

LONGHINI, Renata, et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p. 388-395, 2007.

MANI F, Damasceno HCR, Novelli ELB, Martins EAM, Sforcin JM 2006. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **J Ethnopharmacol**, v.105, p.95-98, 2006.

MEDA, Aline, et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, n.3, p.571-577, 2005.

MELO, M.G.D.; DÓRIA G. A. A.; SERAFINI, M.R.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v.10, n.3, p.03. 2012.

MENEGHELLI, Cristiane, et al. Atividade moduladora do extrato hidroalcoólico de própolis catarinense na formação de vasos sanguíneos. **Repositório UFSC**, p.56-67, 2013.

ORSOLIC, Nada; BASIC, Ivan. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, n.2-3, p.265-273, 2003.

PARK, Yong Kun et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Food Science and Technology** (Campinas), p.1-14, 1998.

PARK, Yong Kun, et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p.997-1003, 2002.

PERDIGÃO, Ana Paula Lima, et al. Compósito de hidroxiapatita, fibroína da seda e ácido hialurônico em defeitos ósseos experimentais na ulna de coelhos. Viçosa, Minas Gerais, **Locus UFV**, p.34-89, 2015.

PEREIRA FILHO, GUSTAVO DE AZAMBUJA et al. Imunologia do transplante de pele. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 38, n.1, p.92, 2009.

REIS FILHO, N., et al. Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ou laserterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.69, n.3, p.603-612, 2017.

SATO, P.M. Inter-relações das características físicas, químicas e biológicas de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil. Monografia de conclusão de curso. **Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro. p.22-29, 2003.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.133, n.2, p.253-260, 2011.

SILVA J.B; COSTA, K. M.F.M.; COELHO, W. A.C.; PAIVA, K.A.R.; COSTA, G. A.V.; SALATINO, A.; FREITAS, C. I.A. BATISTA, J.S. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia aff. Flavocincta* do Rio Grande do Norte. Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.36. n.9, p.1-10, 2016.

SILVA, Ellen Cristina Costa, et al. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. **Química Nova**, v.36, n.5, p.628-633, 2013.

SIMÕES, Cinthia C.; ARAÚJO, Danilo B.; ARAÚJO, Roberto P. C.. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18,n.1, p.84-89, 2008.

SODRÉ, Geni da Silva. Características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) dos estados do Ceará e Piauí. 2005. Tese (Doutorado em Ciências) – **Universidade de São Paulo, São Paulo**, p.00-00, 2005.

STOCK, Daniele; PG, Eduardo M. S.; REYES, Yohandra. Análise de extratos de própolis com diferentes tempos de maturação. **Anais XIX Encontro Anual de Iniciação Científica**, UNICENTRO, Guarapuava –PR. p 34-45, 2010.

TAKIISHI, Tatiana. Caracterização da resposta inflamatória no enxerto singênico e alogênico em modelo experimental de transplante de pele. PhD Thesis. Universidade de São Paulo. p 5-11, 2008.

UZEL A, Sorkun K, Önçag Ö, Çogulo D, Gençay Ö, Salih B 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* 160: 189-195. p 1-9, 2005.

VELAZQUEZ, E., Tournier, H. A., De Buschiazzo, P. M., Saavedra, G., & Schinella, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, n.1-2, p.91-97, 2003.

VICENTINO, Amanda RR; MENEZES, Fábio de Sousa. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.384-387, 2007.

VOLPI N, Bergonzini G 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p.354-361, 2006.

VON HERTWIG, R., Rigueiro, M. P., Rodrigues, P. D., Tôrres, F. A. N., & Nishi, M. Efeito imunossupressor da ciclosporina intra-muscular administrada em diferentes períodos pós-operatórios em um modelo de transplante penetrante de córnea em ratos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.62, n.6, p.717-725, 1999.

WELLINGTON, David; MIKAELIAN, Igor; SINGER, Laura. Comparison of ketamine-xylazine and ketamine-dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance in rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.52, n.4, p.481-487, 2013.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na análise físico-química, o extrato hidroalcoólico de geoprópolis de abelha canudo exibiu maior efeito antioxidante e a geoprópolis de abelha jandaíra apresentou considerável quantidade de fenóis e flavonoides totais.

O extrato hidroalcoólico de própolis verde superou os extratos de geoprópolis de abelhas nativas na redução de edema da inflamação aguda induzida por carragenina.

O extrato de própolis verde e de geoprópolis de canudo (*Scaptotrigona sp.*) exibiram efeito cicatrizante similar ao fármaco registrado (Crema 6A), tanto no tempo quanto na qualidade de cicatrização. Já o extrato hidroalcoólico de geoprópolis da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) exibiu intermediária capacidade de cicatrização.

Sobre a inflamação crônica, o extrato hidroalcoólico geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) demonstrou formação mais adiantada e bem definida de granuloma de corpo estranho, superando os demais extratos testados.

A neoformação de vasos foi satisfatória nos grupos testados com própolis e geoprópolis de acordo com a etapa inflamatória.

Nos transplantes autogênicos, os extratos hidroalcoólicos de própolis verde, de geoprópolis de abelha canudo e jandaíra induziram perceptível retardo no processo de desvitalização, e mantiveram os enxertos firmes e aderidos aos leitos receptores.

Nos transplantes alogênicos, os extratos impeliram discreto retardo no processo de rejeição, e mantiveram os enxertos firmes e aderidos aos leitos receptores.

ANEXO 1

Parecer do comitê de ética para o 1º Artigo/Capítulo II e para o 2º Artigo/Capítulo II



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 20 de novembro de 2019.

PARECER 37/2019

Certificamos que o projeto intitulado " EFEITO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E GEOPRÓPOLIS NA VIABILIDADE DE TRANSPLANTES ALOGÊNICO E AUTÓLOGOS, CICATRIZAÇÃO E NO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO E CRÔNICO EM RATOS (Rattus norvegicus)" protocolo n. 23091.006656/2019-28 sob a responsabilidade de Carlos Iberê alves Freitas, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Arido –UFERSA em reunião de 19/11/2019.

Vigência do projeto	Novembro de 2019 a fevereiro de 2020
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus/Wistar
N. de Animais	36
Peso/idade	Adultos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	LEIAS/UFERSA

Emanuelle Fontenele Rabelo
Emanuelle Fontenele Rabelo

Coordenadora CEUA-UFERSA