

Cicatrização de feridas agudas tratadas com produto em pó à base de própolis verde

Acute wound healing by green propolis-based powder product

Cicatrización de heridas agudas tratadas con producto en polvo a base de propóleo verde

Resumo

Objetivo: avaliar o potencial cicatrizante de um produto em pó à base de própolis verde em lesão aguda induzida em ratos. **Método:** trata-se de um estudo experimental realizado com 27 ratos da linhagem *wistar* divididos aleatoriamente em três grupos. As lesões foram induzidas cirurgicamente e tratadas a cada 48 horas com os produtos em teste (pó à base de própolis verde, Brava *Ostomy Powder*® e soro fisiológico). As lesões foram analisadas macroscópica e microscopicamente no 7º, 9º e 11º dia de pós-operatório. **Resultados:** a maioria das lesões tratadas com pó à base de própolis verde cicatrizou em 11 dias. O produto formulado para este estudo e o comercial mostraram resultados satisfatórios na retração das feridas, atividade anti-inflamatória, angiogênese, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno. **Conclusão:** o tratamento com o produto formulado à base de própolis verde mostrou grande potencial de cicatrização das lesões cutâneas.

Descritores: Própolis; Ferimentos e lesões; Cicatrização; Farmacognosia.

Talita Faraj Faria¹

 0000-0002-3690-2968

Roberta Faraj Faria¹

 0000-0001-7272-5316

Ivone Kamada¹

 0000-0003-2569-8727

Lívia Cristina Lira de Sá Barreto¹

 0000-0001-8197-4349

¹ Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Abstract

Objective: To evaluate the healing potential of a green propolis-based powder product on acute lesions induced in rats. **Method:** This is an experimental study conducted with 27 Wistar lineage rats randomly divided into three groups. The lesions were surgically induced and treated every 48 hours with the test products (green propolis-based powder, Brava *Ostomy Powder*™, and saline solution). The lesions were analyzed macroscopically and microscopically on the 7th, 9th, and 11th postoperative days. **Results:** Most of the lesions treated with green propolis-based powder healed in 11 days. The product formulated for this study and the commercial one showed satisfactory results in wound retraction, anti-inflammatory activity, angiogenesis, fibroblast proliferation, and collagen synthesis. **Conclusion:** Treatment with the green propolis-based product showed great potential for healing skin lesions.

Keywords: Propolis; Wounds and injuries; Wound Healing; Pharmacognosy.

Resumen

Objetivo: evaluar el potencial cicatrizante de un producto en polvo a base de propóleo verde en heridas agudas inducidas en ratas. **Método:** se trata de un estudio experimental realizado con 27 ratas *wistar*, que se separaron de forma aleatoria en tres grupos. Las heridas quirúrgicas fueron tratadas cada 48 horas con los productos en prueba (polvo a base de propóleo verde, Brava *Ostomy Powder*® y solución fisiológica). Las heridas se evaluaron macro y microscópicamente a los 7, 9 y 11 días postoperatorios. **Resultados:** la mayoría de las heridas tratadas con el polvo a base de propóleo verde cicatrizaron en 11 días. El producto formulado para este estudio y el producto comercial mostraron resultados satisfactorios en la retracción de heridas, actividad antiinflamatoria, angiogénesis, proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno. **Conclusión:** el tratamiento con el producto a base de propóleo verde mostró un gran potencial curativo de las lesiones cutáneas.

Palabras clave: Própolis; Heridas y lesiones; Cicatrización de Heridas; Farmacognosia.

Autor correspondente:

Talita Faraj Faria

E-mail: talitafaraj@gmail.com

INTRODUÇÃO

As lesões agudas se originam subitamente a partir de traumas ou cirurgias e a reparação tecidual requer um tempo menor do que as lesões consideradas crônicas, uma vez que geralmente não ocorre nenhum tipo de complicação durante as fases de cicatrização que interfira nesse processo⁽¹⁾.

Após a ocorrência de lesões de qualquer natureza, a cicatrização do tecido lesionado se inicia de maneira complexa e dinâmica, envolvendo fenômenos químicos, biológicos e físicos que ocorrem de forma simultânea e interdependente, variando conforme o tipo de lesão presente (aguda ou crônica), sua localização e o tratamento envolvido⁽²⁾.

Há registro de uso da própolis desde 300 anos a. C. para tratar diversas afecções, incluindo as lesões cutâneas. A própolis é uma substância de aspecto resinoso produzida pelas abelhas, sendo a espécie de *Apis mellifera* a mais comum, que captam exsudato de árvores, plantas e folhas, além do pólen de diversas flores associadas às secreções salivares para produção desse material. A resina está presente nas colmeias para manter a temperatura em torno de 35°C, proteger o local contra a entrada de outros insetos, ocluir aberturas, entre outros⁽³⁻⁴⁾.

A coloração da própolis pode variar entre amarelo, vermelho, marrom e verde, dependendo de sua procedência e da vegetação envolvida. A própolis verde, comumente encontrada em países como Argentina, Uruguai e Brasil, tem sua origem botânica formada principalmente pelo alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC, da família *Asteraceae*), também conhecido como “vassourinha”. Este tipo de própolis é composto pelos derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), diterpenos, tripterenos e flavonoides⁽⁴⁻⁶⁾.

Ao longo dos anos foram descritos mais de 300 elementos na composição química da própolis independente de seu tipo, entre eles os flavonoides, vitaminas E, C e do complexo B, minerais como ferro, zinco, cálcio e potássio, ácidos graxos e fenólicos, proteínas, aldeídos

aromáticos, álcoois e aminoácidos, que variam conforme a origem botânica e geográfica, conferindo a esta resina suas propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, anestésica, imunomoduladora, cicatrizante, entre outras⁽⁶⁻⁷⁾.

No Brasil e em diversos países, há um interesse crescente pelo uso da própolis, seja do extrato produzido a partir da resina *in natura*, seja de outras apresentações como cremes, pomadas, géis, xampus ou curativos para o tratamento de feridas, dada as propriedades supracitadas observadas pela sinergia dos diversos compostos químicos que a resina apresenta⁽⁶⁻⁸⁾.

O tratamento das lesões de pele é um enorme desafio para os profissionais de saúde, devido ao impacto socioeconômico que estas causam para os indivíduos acometidos, seus familiares e serviços de saúde. Este estudo justifica-se pela necessidade de desenvolvimento de uma formulação farmacêutica à base de própolis verde que seja estável, segura e eficaz para o tratamento de lesões de pele *in vivo*, visando uma posterior utilização desse recurso em seres humanos.

Pretende-se que o produto desenvolvido a partir desta pesquisa seja futuramente uma opção de tratamento de lesão de pele, incluindo as dermatites periestomais, por se tratar de uma complicação comumente observada nas pessoas com estomias. A dermatite periestomal pode ser de origem irritativa, quando ocorre o contato da pele com as enzimas digestivas e eletrólitos presentes nas eliminações (fezes e urina), provocando danos que variam desde eritema até uma solução de continuidade na pele. Considera-se dermatite periestomal de origem traumática quando há lesão superficial que acomete a derme, provocada pela retirada da placa adesiva do equipamento coletor⁽⁹⁾.

Assim sendo, considerando a complexidade que envolve o tratamento das lesões de pele, bem como as diversas propriedades dessa resina produzida pelas abelhas, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial cicatrizante

de um produto em pó à base de extrato hidroalcolólico de própolis verde em lesão aguda induzida em ratos.

MÉTODO

Trata-se de um estudo experimental pré-clínico realizado com 27 ratos adultos da linhagem *wistar* no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM/UnB). Na pesquisa foram incluídos apenas animais machos saudáveis para garantir a isonomia da amostra estudada e evitar alterações hormonais que pudessem interferir nos resultados da pesquisa.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília, sob parecer de número 80/2018. A pesquisa se desenvolveu em etapas que compreenderam o desenvolvimento do produto à base de própolis, teste *in vivo* e análise histológica. As etapas de teste *in vivo* e análise histológica se iniciaram no período de março de 2019 a outubro de 2020, após o parecer favorável à execução da pesquisa.

Produção do curativo

A amostra de extrato de própolis verde (lote 74/17) foi cedida pela empresa Mel do Sol. No Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC) da Universidade de Brasília, foi elaborada uma solução contendo extrato hidroalcolólico de própolis verde à 11% e um copolímero acrílico (Eudragit L100). Em seguida, foram produzidas micropartículas dessa solução a partir de um processo de secagem, realizada com auxílio do *Spray Dryer* (Labmaq, MSD 1.0), sem contato com o meio externo. Posteriormente, as micropartículas foram misturadas em morteiro (PRP: EuL100, na proporção de 1:3 p/p) e incorporadas à carboximetilcelulose sódica.

A atividade antioxidante da formulação supracitada foi calculada por meio dos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e *Thiobarbituric Acid Reactive Species* (TBARS). Pelo método DPPH, foi mensurado

o sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil pela substância de interesse, cujo valor foi expresso de acordo com o *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC). O produto produzido à base de própolis verde foi testado em diluições seriadas até que se encontrasse um percentual de descoloração alto, que é inversamente proporcional ao valor de Trolox e equivale a uma maior atividade antioxidante. Pelo DPPH é possível determinar a concentração da formulação farmacêutica em estudo necessária para inibir 50% da atividade dos radicais livres.

No método ABTS, a atividade antioxidante do produto desenvolvido foi medida em diluições seriadas por meio da captura do radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) gerado a partir da oxidação com o sal de persulfato de potássio, que se reduz na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. Por ser solúvel em água ou solventes orgânicos, o radical ABTS é capaz de determinar a atividade antioxidante de produtos lipo e hidrofílicos. Seus valores também são expressos de acordo com o TEAC. O método TBARS foi utilizado para quantificar o malondialdeído (MDA), que é um marcador biológico de dano oxidativo utilizado para avaliar a extensão da peroxidação lipídica, observada nas reações em cadeia dos radicais livres.

A avaliação morfológica, além dos testes para avaliar as características reológicas e efetividade do produto produzido para esta pesquisa foram realizados seguindo a legislação vigente e as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso de própolis em formulações farmacêuticas.

A resina sintética em pó para estomias (Brava *Ostomy Powder*®) da empresa Coloplast (lote 5201536) foi obtida comercialmente pelas pesquisadoras e utilizada no grupo controle positivo deste estudo. Sua formulação contém carboximetilcelulose (CMC), goma guar e goma xantana. Na ausência de produtos disponíveis no mercado, no período da coleta de dados, com as mesmas características do produto à base de

própolis desenvolvido para esta pesquisa e, após análise de sua composição química, optou-se por utilizar a referida resina sintética em pó, uma vez que ela possui a mesma apresentação do produto em teste e por ser utilizada para o tratamento de lesões de pele, como por exemplo as dermatites irritativas periestomais.

Um ensaio de membrana corioalantoide (HET-CAM) também foi realizado em duplicata com 30 ovos embrionados de galinha no 8º dia de incubação, com o objetivo de verificar a toxicidade do produto criado para este estudo, como substituição ao teste *in vivo* de avaliação de toxicidade e potencial irritativo de formulações farmacêuticas. A membrana corioalantoide foi exposta e umectada com solução fisiológica por 20 segundos. Em seguida, foram adicionadas amostras de 50g dos produtos em teste: produto desenvolvido, produto comercial (Brava Ostomy Powder®), solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1M (controle positivo) e solução fisiológica à 0,9% (controle negativo), novamente por um período de 20 segundos. Após o tempo estabelecido, removeu-se as amostras dos produtos em teste e foi avaliada a ocorrência de hemorragia, hiperemia e coagulação na membrana por 20, 130 e 200 segundos.

Após a realização das análises necessárias, tanto do produto produzido para este estudo quanto do produto comercial (Brava Ostomy Powder®), seguiu-se para a próxima etapa, o teste *in vivo*.

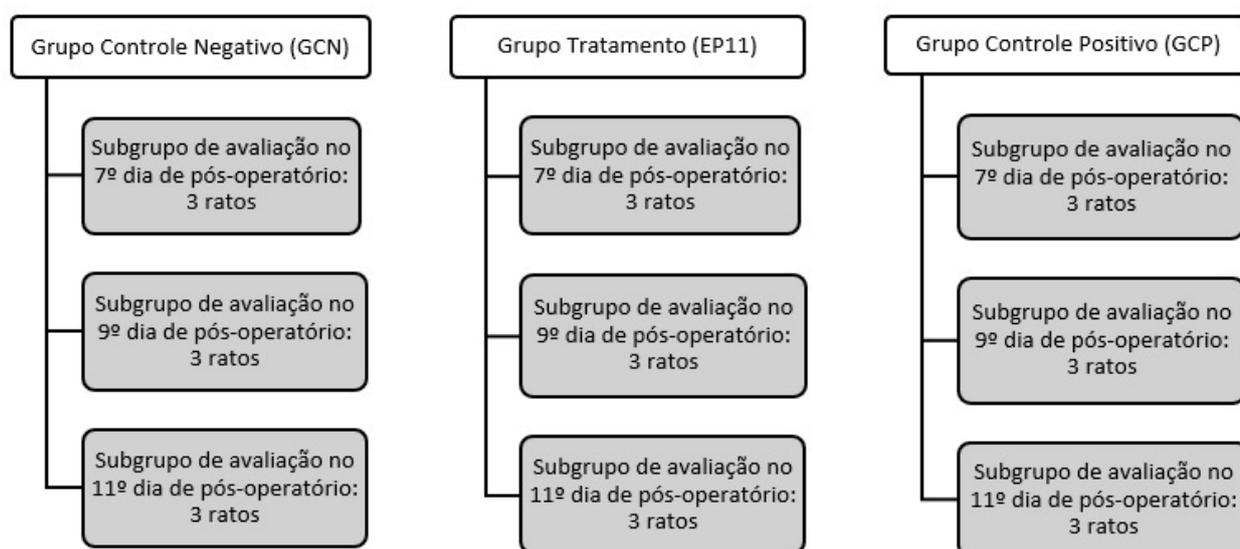
Procedimento cirúrgico para indução das lesões

Os ratos permaneceram em alojamento apropriado, acondicionados em gaiolas de polipropileno (dimensões de 35 cm x 50 cm x 20cm) e tiveram um período de sete dias para ambientação no biotério, com controle da temperatura ambiente (22°C), luminosidade (12h claro/12h escuro) e umidade variando entre 50 e 60%. Todos eles receberam ração balanceada e água *ad libitum* durante o experimento.

Após o período de ambientação no biotério, os animais estavam com oito semanas de vida e foram pesados para cálculo das doses dos medicamentos, apresentando peso corporal que variou de 270g a 380g. A sedação foi realizada com cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (na dose de 100mg/kg e 10mg/kg, respectivamente) via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e realizou-se a tricotomia dos pelos no dorso em uma área de 16 cm²; a antisepsia local foi feita com álcool 70% e álcool iodado 2%.

As lesões foram induzidas cirurgicamente no próprio dorso utilizando-se um *punch* metálico estéril de 6 mm de diâmetro e auxílio de lâmina de bisturi nº 22 para exposição da fáscia muscular. Os ratos foram alocados de forma aleatória simples em três grupos, conforme demonstra a figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de divisão dos grupos e subgrupos de avaliação, Brasília-DF, 2019.



Todos os animais receberam analgesia com dipirona (0,1 mL via subcutânea) por 24h após a confecção das feridas para controle da dor. As lesões foram deixadas cicatrizar por segunda intenção e o curativo foi realizado a cada 48 horas, seguindo o protocolo estabelecido para o estudo: limpeza do leito da lesão com solução fisiológica à 0,9% em temperatura ambiente utilizando uma agulha 25 x 0,8 mm acoplada a uma seringa de 20 mL; aplicação dos produtos em teste, em quantidade suficiente para cobrir todo o leito das lesões, conforme o grupo de estudo: produto em pó à base de extrato hidroalcolico de própolis à 11% (EP11), produto comercial Brava Ostomy Powder® (GCP) e solução fisiológica à 0,9% (GCN). As lesões não foram ocluídas com cobertura secundária e os animais não foram sedados durante a realização dos curativos.

Todo o experimento foi acompanhado pelos veterinários do biotério e, após avaliação dos profissionais em conjunto com as pesquisadoras, optou-se por finalizar o experimento no 11º dia de pós-operatório, devido ao tamanho e peso dos animais naquele momento, visando seu bem-estar, conforme preconiza a legislação vigente que versa sobre o uso de animais em pesquisas.

Avaliação macroscópica

Os ratos foram identificados com numeração de 1 a 27 na calda, para controle da avaliação macroscópica das lesões e realização dos curativos, uma vez que foram acondicionados três animais por gaiola para que mantivessem a socialização entre si, visando seu bem-estar durante a realização do estudo, conforme orientação dos veterinários do biotério.

A tríade de avaliação de feridas criada por Dowsett e colaboradores em 2015 foi utilizada como parâmetro de avaliação macroscópica das lesões, uma vez que considera as características do leito da ferida, bordas e pele adjacente. Ademais, uma escala Likert foi aplicada para avaliação do tecido presente no leito da ferida, exsudação e a presença de crostas, considerando os valores de 0 a 4, sendo 0 equivalente a

ausência do parâmetro avaliado, 1 a presença de 25%, 2 a presença de 50%, 3 a presença 75% e 4 a presença de 100%.

Para a análise morfológica, realizou-se a mensuração periódica do comprimento e largura das lesões com auxílio de régua descartável graduada em milímetros e o registro fotográfico a cada troca de curativo. As imagens foram posteriormente avaliadas através do software ImageJ para cálculo das áreas. Os dados obtidos foram registrados em planilha do Microsoft Excel para posterior análise dos resultados.

Avaliação histológica

No 7º, 9º e 11º dia de tratamento, 3 ratos de cada grupo foram selecionados e, após procedimento de sedação, realizou-se a coleta de fragmentos de tecido com 1 cm de borda íntegra e profundidade que alcançasse a fáscia muscular, com auxílio de bisturi nº 22 para confecção das lâminas histológicas. Em seguida, os animais foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono e suas carcaças foram acondicionadas em sacos brancos identificados, com posterior descarte em local apropriado após tratamento dos resíduos.

As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), além de picosírius para avaliação da proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno, neovascularização e infiltrado inflamatório com auxílio de microscopia óptica por uma histologista experiente e de maneira cegada. Uma escala do tipo Likert foi aplicada para todas as variáveis, considerando os valores de 0 a 3, sendo 0 para ausente, 1 para leve, 2 para moderado e 3 para intenso.

Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 23.0 para Microsoft Windows. A análise dos dados multivariados e qualitativos foram realizados através do teste qui-quadrado. O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para avaliação da associação entre as variáveis comprimento e

largura das lesões. Para comparação entre as variáveis área de lesão e grupos estudados, além da comparação entre as médias das áreas das feridas, foram realizados a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey, após verificação das pressuposições de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. O nível de significância estatístico adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Na avaliação da atividade antioxidante do produto desenvolvido para esta pesquisa, os valores de DPPH, ABTS e TBARS foram respectivamente $531,87 \pm 21,82$ μmol de Trolox/mg, $1178,90 \pm 114,24$ mM de Trolox/mg e $64,09 \pm 8,83\%$. A avaliação morfológica, bem como os outros testes para avaliar as características reológicas e efetividade do produto a base de própolis verde permitiram seu uso na etapa de testes *in vivo*. A partir do ensaio *Henn's Egg Test - Chorioallantoic Membrane Assay* (HET-CAM), foi observada reação não irritante severa tanto do produto desenvolvido quanto do produto comercial utilizados neste estudo, quando em comparação ao controle positivo (hidróxido de sódio 0,1M) e controle negativo (solução fisiológica à 0,9%). Após estas avaliações, os produtos foram considerados seguros para serem aplicados nas lesões.

Os animais se recuperaram do procedimento anestésico e cirúrgico de maneira satisfatória. Durante o experimento, não houve a ocorrência de óbito por complicações inesperadas. Como a maioria dos animais do grupo tratamento (EP11) apresentavam suas lesões cicatrizadas, não houve prejuízo na análise dos dados quanto optou-se por finalizar o experimento nesse período.

A avaliação macroscópica das feridas cirúrgicas foi realizada no pós-operatório imediato (POI), 3º dia de pós-operatório (PO), 5º PO, 7º PO, 9º PO e 11º PO. Por meio dessas avaliações foi possível constatar as

seguintes características relacionadas ao processo cicatricial: no POI, as lesões apresentavam profundidade que alcançava a fáscia muscular (n=27); os animais apresentaram sangramento após a confecção das feridas, contudo, foi observada hemostasia adequada em todos eles ainda no pós-operatório imediato. Não foi observado sangramento nos demais dias de realização dos curativos.

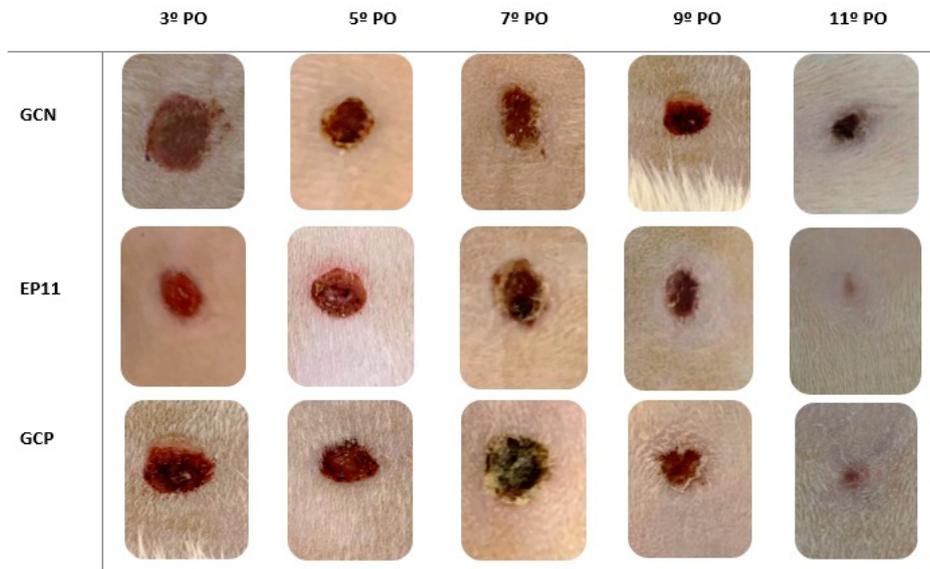
Em relação ao tecido de granulação, foi possível observar sua presença a partir do terceiro dia de avaliação, em 100% dos animais dos grupos estudados (n=27). Mesmo com as lesões expostas ao ambiente, o tecido viável manteve suas características de coloração vermelho-vivo, mas discretamente ressecado,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

Na avaliação da presença de tecido desvitalizado, observou-se a formação de crostas amareladas finas a partir do 3º PO em todos os grupos. Em especial, no GCN (n=9), as crostas recobriam todo o leito das lesões. Foi possível a remoção das crostas por desbridamento mecânico, sem intercorrências durante o procedimento.

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

As bordas das lesões permaneceram regulares e aderidas desde o pós-operatório imediato até o 11º PO, em 100% dos animais dos três grupos. Não houve sinais de descolamento ou epíbole durante o experimento. A região perilesão também permaneceu íntegra ao longo dos 11 dias de avaliação. A figura 2 mostra a evolução das lesões por grupo de tratamento do 3º ao 11º PO.

Figura 2 – Aspectos macroscópicos das lesões dos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (GCP). Brasília-DF, Brasil, 2019.



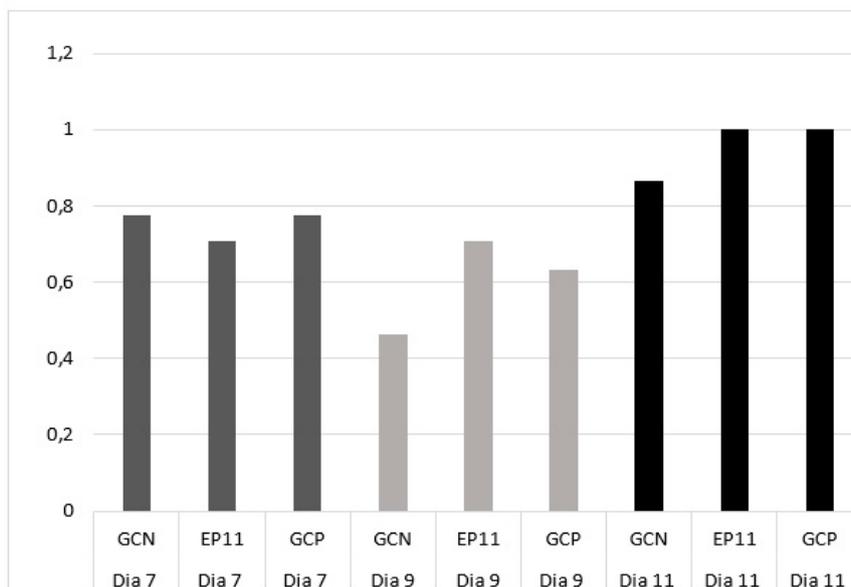
Durante a realização do experimento, não foram observados sinais clínicos de infecção nas lesões dos animais tratados nos três grupos de estudo, como presença de exsudação purulenta com ou sem odor, alteração de coloração no tecido de granulação, sangramento, edema, sinais clínicos sugestivos de formação de biofilme e/ou hiperemia com calor local em região perilesão.

A comparação entre os grupos EP11 e GCP em relação ao placebo (GCN) mostrou significância estatística para as seguintes variáveis: tecido de granulação ($p = 0,023$) e tecido de epitelização ($p = 0,041$). Não foi observada

significância estatística na comparação entre os três grupos para as variáveis definidas como tecido desvitalizado ($p = 0,67$), crostas ($p = 0,061$) e exsudação ($p = 0,343$).

A partir do 3º PO as lesões apresentaram profundidade superficial nos três grupos de estudo ($n=27$). Observou-se contração das lesões a partir do terceiro dia de coleta de dados, em todos os grupos. A avaliação da associação linear entre comprimento e largura das feridas do 7º ao 11º PO mostrou valores positivos para os três grupos (Figura 3).

Figura 3 – Correlação entre o comprimento e largura das lesões. Brasília-DF, Brasil, 2019.



Em relação às áreas das lesões no 7º, 9º e 11º PO, observou-se valores de p menores que 0,05 nos três dias de avaliação ($p = 0,00$ para os dias 7 e 9; $p = 0,03$ para o dia 11). Na comparação entre as médias das áreas das lesões foi possível

observar diferença significativa entre o grupo tratamento (EP11) e grupo controle positivo (GCP) em relação ao grupo controle negativo (GCN), visto que os valores de p também foram menores ou iguais a 0,05 (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre as médias das áreas das lesões entre os três grupos estudados. Brasília-DF, Brasil, 2019.

Tempo de avaliação (dias)	Tratamento	Média das áreas das lesões (cm ²)	Erro padrão	p valor	
7	GCN (SF 0,9%)	EP11	0,095	0,01679	0,00
		GCP	0,068	0,01679	0,03
9	GCN (SF 0,9%)	EP11	0,108	0,01473	0,00
		GCP	0,983	0,01473	0,00
11	GCN (SF 0,9%)	EP11	0,053	0,01700	0,04
		GCP	0,050	0,01700	0,05

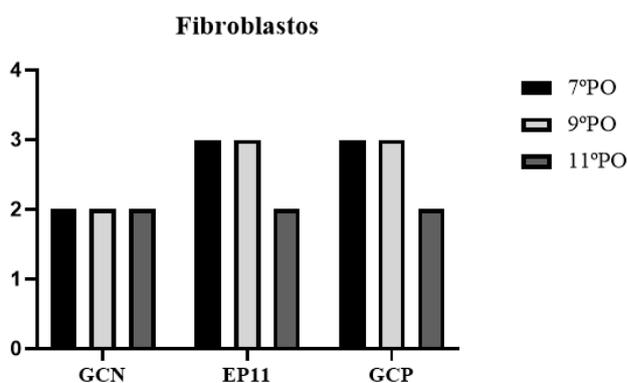
GCN - Grupo Controle Negativo; EP11 - Grupo Tratamento (produto desenvolvido a base de extrato de própolis à 11%); GCP - Grupo Controle Positivo.

Ao final do experimento (11º PO), a cicatrização total ocorreu em 66,66% ($n=2$) das lesões no grupo tratamento (EP11) e 33,33% ($n=1$) nas lesões do grupo controle positivo (GCP). Neste mesmo período, o grupo controle negativo (GCN) apresentou apenas cicatrização parcial em 100% dos animais.

Na análise histológica, o grupo controle negativo (uso da solução fisiológica à 0,9%) apresentou intensa quantidade de infiltrados inflamatórios no 7º PO, como células mono e polimorfonucleares. No 9º e 11º PO observou-se a presença de quantidade moderada desses infiltrados no GCN. O grupo tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®) apresentou moderada quantidade de infiltrados inflamatórios no 7º e 9º PO, com redução dessas células no 11º PO em ambos os grupos.

Em relação aos fibroblastos, observou-se quantidade moderada para o grupo controle negativo (GCN) nos três dias de avaliação e intensa quantidade para os grupos tratamento (EP11) e controle positivo (GCP) nos dias 7 e 9. Houve intensa deposição de colágeno nos grupos tratamento e controle positivo no 7º, 9º e 11º PO, como demonstra a Figura 4.

Figura 4 - Presença de fibroblastos no 7º, 9º e 11º PO nos grupos controle negativo (GCN), tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®). Brasília-DF, 2019.



Fonte: dados da pesquisa.

Sobre a neovascularização, os grupos tratamento (EP11) e controle positivo (Brava Ostomy Powder®) tiveram a formação dos novos vasos estimulada, principalmente no 7º e 9º PO.

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

três grupos para a variável definida como infiltrados inflamatórios ($p=0,06$).

DISCUSSÃO

Os dados obtidos pela análise da atividade antioxidante do produto desenvolvido para este estudo corroboram os resultados de outros estudos. Para a utilização de micropartículas à base de própolis, os valores de IC50 encontrados no estudo de Baysan, Elmas e Koç em 2019 foram semelhantes aos encontrados na presente pesquisa, variando entre $215,23\pm 19,57$ e $724,52\pm 2,09\text{mg.g}^{-1(10)}$. A avaliação pelos métodos ABTS e TBARS para micropartículas à base de própolis verde, marrom e vermelha também mostrou resultados semelhantes a este estudo, que variaram de $10623,48\pm 69,85$ a $15042,12\pm 55,56$ μmol de Trolox/mg de própolis (método ABTS) e foi de 64,08% para o método TBARS⁽¹¹⁾.

O estudo da atividade antioxidante do curativo desenvolvido, bem como a análise de outras características do produto e sua segurança biológica testada por meio do ensaio HET-CAM permitiram sua aplicação nas lesões provocadas cirurgicamente nos ratos.

Mesmo com o avanço tecnológico que envolve o tratamento de feridas, observado nos últimos anos, este ainda se configura como um desafio para os enfermeiros, dada a disponibilidade de diversos produtos, sua distribuição, diferentes respostas dos indivíduos diante da conduta estabelecida e adesão ao tratamento. O uso de ratos em pesquisas que visem a avaliação da reparação cutânea se justifica, apesar das diferenças anatômicas, imunológicas e morfológicas, pela similaridade das fases de cicatrização como a inflamação, proliferação e remodelação⁽¹²⁾.

No presente estudo, os animais permaneceram com as lesões expostas durante toda a coleta de dados devido à dificuldade para realização do curativo oclusivo. Optou-se por alojar três animais em cada gaiola para que eles socializassem entre si, mas reduzisse a possibilidade de retirada dos produtos aplicados nas lesões.

Após a realização dos curativos, as pesquisadoras permaneceram no biotério por mais um período para garantir que o produto ficaria em contato com a lesão o maior tempo possível.

A manutenção da umidade das feridas é obtida por meio dos curativos oclusivos. As lesões em que ocorre o ressecamento do leito apresentam alterações na produção dos fatores de crescimento que estimulam a angiogênese e a epitelização, levando à formação de tecido desvitalizado (necrose) pela hipóxia, retardando o processo de reparação tecidual⁽¹³⁾. tecido necrótico encontrado em alguns animais a partir do 7º PO pode ter ocorrido, em parte, pela exposição das lesões ao ambiente.

Um estudo pré-clínico realizado em 2021 avaliou o uso de diferentes produtos para fixação de curativos em camundongos, como atadura de crepom, bandagem autoaderente, fita microporosa e filme de poliuretano transparente. Amorim e colaboradores definiram que a melhor fixação foi aquela realizada com o filme de poliuretano transparente, aplicado sobre a cobertura primária, medindo 3 cm de comprimento e 15 cm de largura (vertical x horizontal), uma vez que proporcionou a integridade do curativo por 48 a 96 horas⁽¹⁴⁾. Sugere-se que, em estudos realizados com animais futuramente, seja aplicada a cobertura em teste ocluída com filme transparente, visando contemplar todos os princípios do curativo ideal descritos na literatura.

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

Coelho e colaboradores realizaram um estudo em 2021 para comparar a taxa de cicatrização em pacientes diabéticos com úlcera

nos pés utilizando-se biomembrana de proteína do látex e hidrocoloide em pó. Os resultados mostraram taxa de cicatrização semelhantes para ambos os produtos, evidenciando que não houve prejuízo no processo cicatricial, tanto no grupo experimental quanto no grupo controle⁽¹⁵⁾.

Neste estudo, o uso de produtos com apresentação em pó utilizados no grupo experimental (EP11) e no controle (GCP) não demonstrou efeitos negativos significativos relacionados ao processo de reparação tecidual, uma vez que foi observada apenas a formação de crosta que recobriu parcialmente o leito das lesões nos dois grupos e era de fácil remoção, o que foi feito durante as trocas de curativo.

Em relação à mensuração das lesões de pele, trata-se de um parâmetro importante de avaliação dos enfermeiros quanto ao potencial de cicatrização e a resposta ao tratamento implementado⁽¹⁶⁾. A avaliação das áreas das lesões e a comparação entre as médias das áreas revelou o efeito satisfatório tanto do grupo tratamento (EP11) quanto do grupo controle positivo (GCP) na cicatrização das feridas, uma vez que houve redução progressiva das áreas ao longo dos dias.

Cabe destacar que, independentemente do método utilizado para a mensuração das feridas, é importante que os avaliadores mantenham a técnica durante todo o processo de reparação tecidual, para preservar a padronização, objetividade e acurácia da avaliação.

No que concerne ao tempo de cicatrização, a maioria das lesões tratadas com o produto em pó à base de própolis verde cicatrizou em 11 dias, confirmando dados de outros estudos publicados que utilizaram essa resina e mostraram um tempo de cicatrização total variando entre 10 e 15 dias, tempo médio em que ocorre o realinhamento das fibras de colágeno e maior resistência do novo tecido formado⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Na análise microscópica, observou-se que os produtos usados nos grupos EP11 e GCP foram biocompatíveis, não exercendo efeitos deletérios sobre as lesões como presença de reações inflamatórias intensas e prolongadas.

As reações inflamatórias observadas nos grupos tratamento e controle positivo variaram de leve a moderada, diferente da resposta moderada a intensa observada no grupo controle negativo, evidenciando o efeito benéfico da utilização tanto do produto criado para este estudo quanto do produto comercial em comparação.

Na ocorrência de uma solução de continuidade na pele, observa-se a migração imediata das células polimorfonucleadas que, além de realizar a fagocitose dos microrganismos e do tecido desvitalizado, estimulam a liberação de fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, que favorecem a proliferação e a migração dos fibroblastos a partir das margens da ferida^(13,19). Os grupos EP11 e GCP mostraram um fluxo equilibrado de polimorfonucleados e mononucleados no 7º, 9º e 11º PO, o que favoreceu o processo de organização do tecido de granulação e, consequentemente, a cicatrização das lesões.

Outros estudos também descreveram os efeitos anti-inflamatórios da própolis, como sua capacidade de atuação na redução do edema e a quimiotaxia de células essenciais para o processo de reparação tecidual⁽²⁰⁻²¹⁾.

Os resultados observados na avaliação da presença de fibroblastos, deposição de colágeno e neovascularização para os grupos EP11 e GCP demonstraram os efeitos benéficos dos dois produtos testados em relação à reparação tecidual. Na fase proliferativa, os fibroblastos produzem colágeno tipo III que, com auxílio dos macrófagos, vão se transformar em colágeno tipo I e conferir resistência ao sistema tegumentar, uma vez que são responsáveis pela reparação do tecido conjuntivo e fornecem sustentação às células da epiderme, sendo tais fatores também relevantes para a cicatrização de feridas agudas ou crônicas⁽²²⁻²³⁾. Nesta pesquisa, foi possível constatar uma resposta discretamente superior no grupo tratado com a própolis verde, uma vez que 66,66% dos animais deste grupo tiveram suas feridas cicatrizadas no 11º PO.

São considerados curativos ideais aqueles que apresentem características como ser de fácil aplicação e remoção, prevenção de contaminação

da lesão, promoção da formação adequada do tecido de granulação, entre outros. Apesar de não ter sido realizada a coleta de amostras específicas para análise da presença de microrganismos patogênicos, a ausência de sinais de infecção nas lesões observada pelas pesquisadoras e os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que o uso do produto em pó à base de própolis verde inibiu a proliferação de microrganismos que pudessem causar um processo infeccioso nos 11 dias de avaliação.

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

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa experimental evidenciaram que o uso tópico do produto formulado à base de extrato hidroalcoólico de própolis verde, na concentração de 11%, interferiu de maneira positiva no processo de cicatrização das lesões cirúrgicas induzidas nos animais, o que se observou pela análise macroscópica e histológica das feridas.

O presente estudo possibilitou ampliar os conhecimentos relacionados ao uso da própolis verde e sua participação no processo de cicatrização de lesões de pele. Dessa forma, a formulação desenvolvida nesta pesquisa pode ser considerada um curativo potencial para o tratamento de feridas agudas, havendo a necessidade ainda de realização de estudos envolvendo seres humanos que possibilitem a indicação e o uso da resina de maneira segura.

Destacamos como limitação deste estudo a exposição do leito das lesões cirúrgicas durante o experimento, pela impossibilidade de oclusão com coberturas secundárias na ocasião, o que pode ter favorecido a formação de crostas e necrose em alguns animais pela manutenção do tecido de granulação neoformado exposto ao ar ambiente, provocando um ressecamento do leito da ferida, além de permitir também

maior exposição aos microrganismos presentes no ambiente e redução do tempo de contato dos produtos testados com as lesões. Assim, torna-se necessária a oclusão das lesões em pesquisas futuras para melhor avaliação da resposta aos produtos em teste e redução dos fatores que possam contribuir para o retardo do processo cicatricial.

REFERENCES

1. Gomes FP, Galvão NS, Albuquerque AD. Perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes com lesões agudas e crônicas em atendimento ambulatorial. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 2021;13(2):e5196. <https://doi.org/10.25248/reas.e5196.2021>.
2. Moreski DAB, Leite-Mello EVS, Bueno FG. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. *Arq. ciências saúde UNIPAR*. 2018;22(1):63-69. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v22i1.2018.6300>.
3. Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): a review. *Saudi J Biol Sci*. 2019;26(1):1695-1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>
4. Rojczyk E, Klama-Baryla A, Labus W, Wilemska-Kucharzewska K, Kucharzewski M. Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by polish studies. *J Ethnopharmacol*. 2020;262:113159. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113159>
5. Chen L, Liu Y, Chen L, Zhang X, Feng F, Zhang F. Determination of phenolic compounds in Chinese poplar propolis, Brazil green propolis and poplar gum by high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and preliminary study of the identification of adulteration. *Se Pu*. 2019;37(1):40-45. <https://doi.org/10.3724/SPJ.1123.2018.09003>.
6. Dambros Filho E, Hey A, Dangui AZ, Sanches CGS, David LE, Carraro E, et al. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* D.C contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Braz J Dev*. 2021;7(1):5830-5848. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-396>
7. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Potencial role of propolis in wound healing: biological properties and therapeutic activities. *Biomed Pharmacother*. 2018;98(1):469-483. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.069>.

8. Salgueiro FB, Castro RN. Comparação entre a composição química e a capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. *Quim. Nova.* 2016;39(10):1192-1199. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20160136>.
9. Stelton S. Stoma and peristomal skin care: a clinical review. *Am J Nurs.* 2019;119(6):38-45. <https://doi.org/10.1097/01.NAJ.0000559781.86311.64>.
10. Baysan U, Elmas F, Koç M. The effect of spray drying conditions on physicochemical properties of encapsulated propolis powder. *J Food Process Eng.* 2019;e13024. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13024>.
11. Andrade JKS, Denadai M, Andrade GRS, Nascimento CC, Barbosa PF, Jesus MS, Narain N. Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. *Food Res Int.* 2018;109:278-87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.048>
12. Zomer HD, Trentin AG. Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research. *J Dermatol Sci.* 2018;90(1):3-12. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.009>.
13. Borges EL, Saar SRC, Magalhães MBB, Gomes FSL, Lima VLAN. *Feridas: como tratar.* 2. ed. Belo Horizonte: Coopmed; 2010.
14. Amorim GL, Guillen MRS, Vieira PC, Barcelos LS, Borges EL. Contributions of nurses in basic research: dressing fixation model for excisional cutaneous wounds of mice. *Estima (online).* 2021;19:e1221. https://doi.org/10.30886/estima.v19.1038_IN.
15. Coelho MMF, Menezes LCG, Oliveira SKP, Bonfim ADAC, Cavalcante VMV, Moraes JT, et al. Healing rate in diabetic foot ulcers treated with biomembrane and hydrocolloid powder: randomized clinical trial. *Estima (online).* 2021;19:e0621. https://doi.org/10.30886/estima.v19.986_IN
16. Mehl AA, Schneider B Jr, Schneider FK, Carvalho BHK. Measurement of wound area for early analysis of the scar predictive factor. *Rev. latinoam enferm.* 2020;28e:3299. <http://dx.doi.org/10.1590/1518-8345.3708.3299>
17. Mezadri TJ, Leite MF, Staack Júnior MC, Colchon PH, Balan AB, Zanatta ML, et al. Evaluation of the contraction of cutaneous wounds in wistar rats treated with Brazilian green propolis gel. *Latin American journal of pharmacy.* 2009 [citado em 16 agosto 2023];28(5):762-7. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7833>
18. Batista LLV, Campesatto EA, Assis MLB, Barbosa APF, Grillo LAM, Dornelas CB. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2012;39(6):515-520. <http://doi.org/10.1590/s0100-69912012000600012>
19. Souza PG, Castro MS, Silva LP. A biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele. *Braz J Dev.* 2021;7(3):28989-29010. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-560>.
20. Rahal SC, Bracarense APFRL, Tanaka CY, Grillo TP, Leite CAL. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. *Arch. vet. sci.* 2003;8(1):61-67. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v8i1.4018>
21. Torres MLM, Lima BPN, Marucci MC, Negrão V. Uso de pomada de própolis brasileira tipificada e DMSO para tratamento de feridas cirúrgicas. *Braz. J. Nat. Sci.* 2021 [citado em 16 agosto 2023];4(2):e1422021. Disponível em: <https://www.bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/142/119>
22. Medeiros MMM. Efeitos *in vitro* da papaína em fibroblastos humanos oriundos de pele [Tese]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2021. 65 p.
23. Oliveira NR, Silva IA, Pinto RR. Colágeno: uma breve revisão. *Braz J Dev.* 2021;7(11):103346-103355. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n11-112>

Editores responsáveis

Patrícia Pinto Braga | Editora Chefe

Juliano Teixeira Moraes | Editor Científico

Nota: O presente estudo é um recorte da Tese de Doutorado intitulada “*Estudo da atividade cicatrizante da própolis verde no tratamento de lesões de pele induzidas em ratos wistar adultos*”.

Recebido em: 26/07/2022

Aprovado em: 01/07/2023

Como citar este artigo:

Faria TF, Faria RF, Kamada I, Barreto, LCLS. Cicatrização de feridas agudas tratadas com produto em pó à base de própolis verde. Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro. 2023;13:e4796. DOI: <http://doi.org/10.19175/recom.v13i0.4796>