



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
CAMPUS PICOS/PI
CURSO LICENCIATURA EM QUÍMICA**

FELIPE SOARES SENA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA COM
EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS PARA FINS BIOMÉDICOS**

**PICOS/PIAUÍ
2018**

FELIPE SOARES SENA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA COM
EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS PARA FINS BIOMÉDICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia)
apresentado como exigência parcial para obtenção
do diploma do Curso de Licenciatura em Química
do Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Piauí. Campus Picos.

Orientador: Prof. Haroldo Reis Alves de Macêdo

PICOS

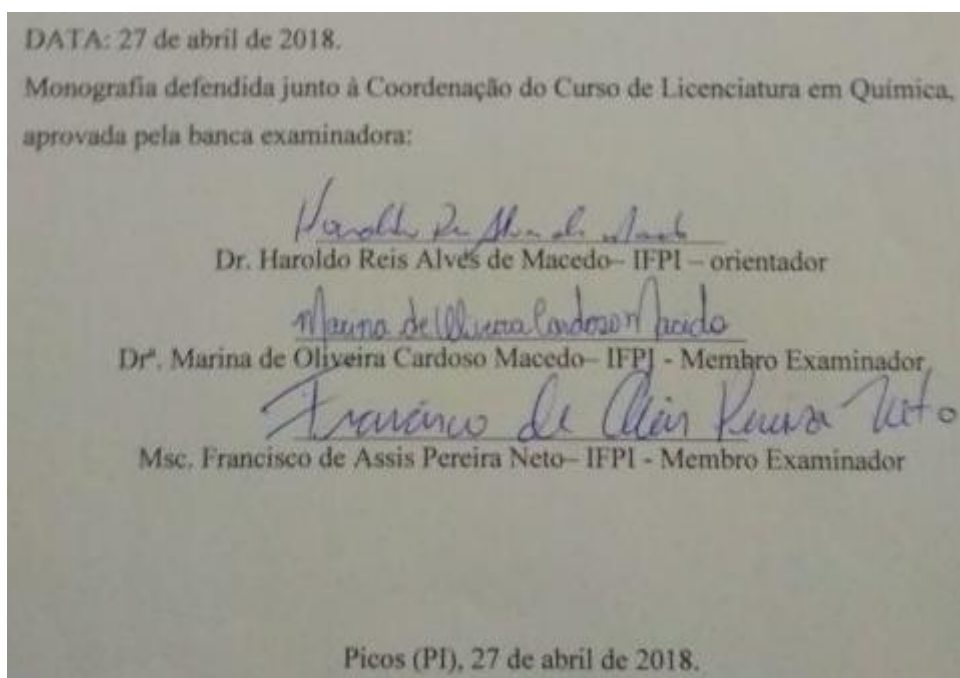
2018

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA COM EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS PARA FINS BIOMÉDICOS

Trabalho de Conclusão de Curso (monografia) apresentado como exigência parcial para obtenção do diploma do Curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. Campus Picos.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA



Dedico este trabalho a minha mãe
(Irene Soares Sena) que esteve sempre presente
em minha vida e sem ela este e muitos
dos meus sonhos não se realizariam.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre ter me dado saúde e força de vontade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Haroldo Reis Alves de Macêdo e a Prof. Dr^a Marina de Oliveira Cardoso Macêdo pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos a pesquisa.

Ao Instituto Federal do Piauí Campus Picos, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

A industrias Mel Wenzel por fornecer própolis para pesquisa.

Ao Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa por ceder o Laboratório de Pesquisa I da Universidade Federal do Piauí para os testes de toxicidade e todos os pesquisadores e amigos em especial a Layde pelo auxílio nos bioensaios.

Ao laboratório de pesquisa do IFPI Campus Picos para produção e caracterização das membranas e aos colegas e amigos da equipe de pesquisa Quitosana.

A minha mãe Irene Soares Sena pelo amor, apoio e incentivo.

Aos meus colegas e amigos que sempre estiveram presentes nas horas boas e ruins Ana Carla, Anne, Elielma, Gean e Joanna, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram de alguma maneira para o meu aprendizado.

“Viver é arriscar tudo. Caso contrário você é apenas um pedaço inerte de moléculas montadas aleatoriamente à deriva onde o universo te sopra ”.

Rick Sanchez

RESUMO

A quitosana é um produto natural, de baixo custo, renovável e biodegradável. Por suas propriedades de aceleração na cicatrização de lesões, biocompatibilidade e por ter baixa toxicidade tem sido fonte de pesquisa na indústria farmacêutica e biomédica. A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina de baixo peso molecular, sua estrutura é formada pela repetição das unidades 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e N-acetil-2-deoxi-D-glicopirranose, as unidades são unidas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4). A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso coletado pelas abelhas dos ramos, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores, tem propriedades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, atividade cicatrizante entre outras, sua ampla aplicação é explicada pela composição química que inclui flavonoides, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides, esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades. Depois de coletada a própolis passa por um processo de trituração e homogeneização, em seguida é adicionada ao etanol em banho de água termostatizada para obtenção do extrato alcoólico de própolis. Neste trabalho incorporou-se o extrato alcoólico de própolis as membranas de quitosana afim de obter-se um biomaterial com propriedades diferentes das encontradas na membrana somente com quitosana. As membranas de quitosana e quitosana com extrato alcoólico foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, molhabilidade, energia de superfície. A adição de extrato alcoólico não alterou a topografia das membranas. Entretanto nos testes de molhabilidade observou-se o aumento na hidrofiliabilidade, devido ao aumento da componente polar observado no ensaio de energia de superfície. Nos testes de toxicidade para o extrato alcoólico este não apresentou efeitos tóxicos. As membranas de quitosana com extrato de própolis podem ser uma nova opção para a fabricação de biomateriais devido as propriedades citadas acima.

Palavras-chave: Membranas, quitosana, própolis, biomaterial.

ABSTRACT

Chitosan is a natural, low-cost, renewable and biodegradable product. Due to its accelerating properties in wound healing, biocompatibility and low toxicity, it has been a source of research in the pharmaceutical and biomedical industry. Chitosan is obtained by the deacetylation of low molecular weight chitin, its structure is formed by the repetition of 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose and N-acetyl-2-deoxy-D-glucopyranose units, the units are joined by β -bonds (1 $\rightarrow$ 4). Propolis is a complex mixture composed of resinous material collected by the bees of the branches, flowers, pollen, shoots and exudates of trees, has antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, cicatrizing activity among others, its wide application is explained by the chemical composition which includes flavonoids, aromatic acids and esters, aldehydes and ketones, terpenoids and phenylpropanoids, steroids, amino acids, polysaccharides, hydrocarbons, fatty acids and various other compounds in small amounts. After the propolis is collected, it undergoes a process of grinding and homogenization, then it is added to the ethanol in a thermostated water bath to obtain the alcoholic extract of propolis. In this work the propolis alcoholic extract was incorporated the chitosan membranes in order to obtain a biomaterial with properties different from those found in the membrane only with chitosan. The membranes of chitosan and chitosan with alcoholic extract were characterized by scanning electron microscopy, wettability, surface energy. The addition of alcoholic extract did not alter the topography of the membranes. However in the wettability tests the increase in hydrophilicity was observed due to the increase of the polar component observed in the surface energy test. In the toxicity tests for the alcoholic extract this showed no toxic effects. Chitosan membranes with propolis extract may be a new option for the manufacture of biomaterials because of the properties cited above.

Key words: Membranes, chitosan, propolis, biomaterial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 01 – Dinâmica entre o ângulo de contato de membrana pura e com própolis a 2,85, 4 e 15%.	52
Gráfico 02 - Energia superficial das membranas de quitosana pura e com própolis.	53
Figura 01 - Estruturas da Pinocembrina (a); Galangina (b); Ester feniletil do ácido caféico (c)	32
Figura 02 - Estruturas da 3,4-di-hidroxi-4-metoxialergiozina (a); 4-metoxidalbergion (b); ceraroina (c)	33
Figura 03 - Estrutura do Eugenol (a); Metileugenol (b)	35
Figura 04 - Estruturas da Crisina (a) e Kaempferol (b)	36
Figura 05 - Estrutura da flavona	36
Figura 06 - Estrutura da quitina	37
Figura 07 - Estrutura da quitosana	38
Figura 08 - Estrutura da doxorubicina (a) e glicosamina (b)	40
Figura 09 - MEV SHIMADZU modelo SSX-550	45
Figura 10 - Goniômetro	46
Figura 11 - Interface do Programa Surftens formação do círculo e sua respectiva tangente para obtenção do ângulo de contato	47
Figura 12 - Equação de Fowkes	47
Figura 13 - Microscopia eletrônica da superfície das membranas de quitosana e própolis, membrana pura (a); 2,85% (b); 4% (c)	50
Figura 14 - Membrana de quitosana	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Raízes dos bulbos de allium cepa	55
Tabela 02 - Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico da própolis a 15% em células meristemáticas de Allium cepa.	56

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

IFPI	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí
UFPI	Universidade Federal do Piauí
CD4 ⁺	Grupamento de diferenciação 4 ou <i>cluster of differentiation</i> , em inglês
HSV	Herpes simplex vírus
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
%	Porcentagem
β	Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO	31
2.1 Própolis	31
2.2 Aplicações da própolis	32
2.3 Quitosana	37
2.4 Aplicações da quitosana	38
2.5 Quitosana e própolis	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.1.1 Objetivos específicos	43
4. METODOLOGIA	44
4.1 Materiais utilizados	44
4.1.1 Reagentes	44
4.2 Métodos	44
4.2.1 Preparação de membranas de quitosana	44
4.2.2 Análise de superfície	45
4.2.4 Energia de superfície	47
4.2.5 Teste de toxicidade	48
4.2.5.1 <i>Allium cepa</i>	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
5.2 Análise de molhabilidade	51
5.3 Energia de superfície	52
5.4 Teste de toxicidade	54
5.4.1 <i>Allium cepa</i>	54
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Os biomateriais podem ser qualquer tipo de material de origem natural ou sintética e tem aplicações em diversas áreas, são amplamente pesquisados na área biomédica pelo fato de serem substância ou combinações de substâncias, sintética ou natural, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Podem ser classificados de acordo com sua composição como cerâmicos poliméricos ou metálicos (LAVICK e LANGER, 2004).

A quitosana é um biomaterial, obtido pela desacetilação da quitina, que é proveniente da carapaça de crustáceo. Sua estrutura trata-se de um polissacarídeo, formado por uma sequência linear de açúcares monoméricos do tipo β -(1-4)2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (Nacetilglicosamina), a sua estrutura molecular é quimicamente similar à fibra vegetal celulose, a diferença está somente nos grupos funcionais (OH) da celulose e (NH₂) da quitosana (AZEVEDO *et al.*, 2007).

A Quitosana é amplamente utilizada em procedimentos para Regeneração de pele, uma vez que apresenta efeitos antimicrobianos, biocompatibilidade e ainda estimula a proliferação celular (ZARGAR *et al.*, 2005). Em adição, possui atividades hemostática, fungicida, antibacteriana e antitumoral, podendo ainda ser utilizado no tratamento da obesidade, na produção de microesferas para a incorporação e liberação controlada de variados fármacos, na preparação de filmes para embalagens de alimentos, de fios cirúrgicos, de materiais para regeneração óssea e especialmente, de curativos (MI *et al.*, 2001).

O extrato alcoólico da própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória, etc. (LUTOSANA *et al.*, 2008). A própolis vem sendo usado desde os primórdios da civilização, povos como os egípcios, gregos e romanos já a utilizavam na medicina para embalsamar cadáveres por suas características anti-putrefativas. O uso de extratos de própolis na medicina popular data de 300 a.C. (SILVA *et al.*, 2006).

As amostras tropicais de própolis, especialmente as brasileiras, têm mostrado diferenças significantes nas suas composições químicas em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira tem se tornado objeto de

grande interesse por parte dos cientistas (TRUSHEVA et al., 2006).

A membrana de quitosana em sua forma simples apresenta propriedades de cicatrização a ferimentos, visando contribuir para o campo da biomedicina utilizando um produto produzido por empresas apícolas da região de Picos/PI foi adicionado própolis a sua composição objetivando melhorar as membranas de quitosana e realizada sua caracterização para determinar se houve alteração nas suas propriedades.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Própolis

A Própolis é um material resinoso que possui mistura complexa coletado pelas abelhas em exsudatos resinosos de árvores, ramos de flores, pólen, brotos, botões florais, na colmeia as abelhas ainda adicionam secreções salivares e enzimas a sua composição (PEREIRA et al., 2002). É utilizada pelas abelhas para a proteção da colmeia contra insetos e microrganismos, mumificação de insetos e reparo a danos a colmeia (LUTOSANA et al., 2001).

A composição química da própolis, está intimamente relacionada a origem geográfica e ecologia da flora visitada pelas abelhas. Bem como variando de acordo com a espécie e a variabilidade genética das rainhas. (Park et al., 2002). Pelo menos 200 compostos foram identificados em diferentes amostras de própolis, com mais de 100 em cada uma há também na sua constituição elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (MARCUCCI et al., 2001).

Os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxo, aminoácidos, esteroides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais. Detalhes sobre a composição da própolis podem ser encontrados em (MENEZES et al., 2005).

Flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos são encontrados em pequenas quantidades também na própolis (HU et al., 2005).

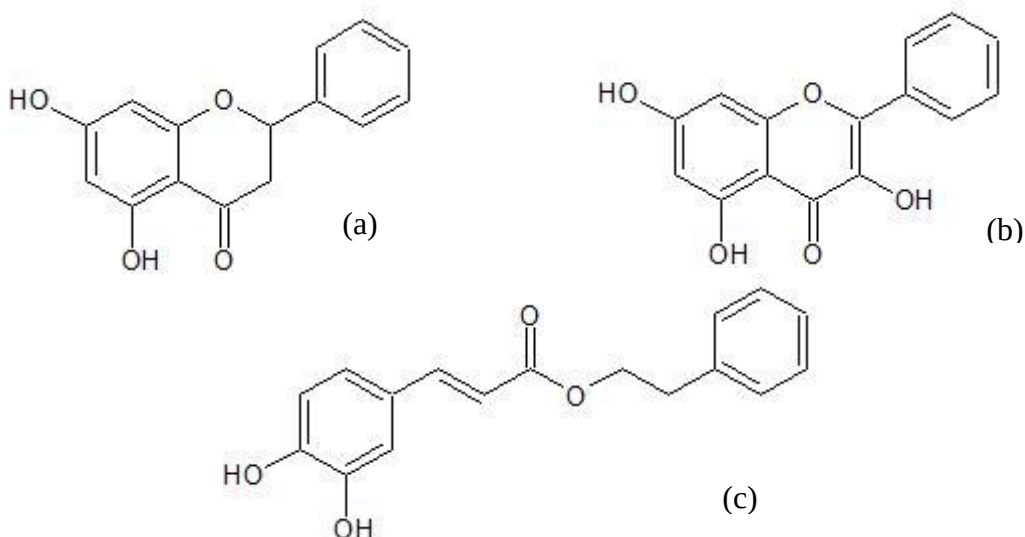
A própolis na maioria de suas aplicações é utilizada o extrato alcoólico para obtenção da própolis passa por um processo de trituração, homogeneização e filtragem em seguida é adicionada ao etanol em banho de água termostatizada para obtenção do extrato alcoólico de própolis.

2.2 Aplicações da própolis

A própolis possui diversas aplicações devido a sua variabilidade química, suas propriedades são atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e anestésica. A propriedade antimicrobiana da própolis em inibir o desenvolvimento de microrganismos é a atividade mais conhecida entre os pesquisadores e também a mais comprovada cientificamente. Utilizando o extrato de própolis foi mostrado que sua atividade antibacteriana contra *paenibacillus larvae* está relacionada com compostos flavonoides presentes em sua composição a concentração de 10 mg/mL de extrato da própolis inibiram significativamente o crescimento de *P. larvae* (MIHAL et al., 2012).

São atribuídas principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol, galangina e ao éster feniletil do ácido caféico, com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição do RNA-polimerase bacteriano, inibem a transcrição por se ligar fortemente ao DNA duplex, e assim, impedir que seja molde para a transcrição (UZEL et al., 2005). A figura 01 (a); (b) e (c) apresentam as estruturas químicas da pinocembrina, galangina e éster feniletil do ácido caféico respectivamente.

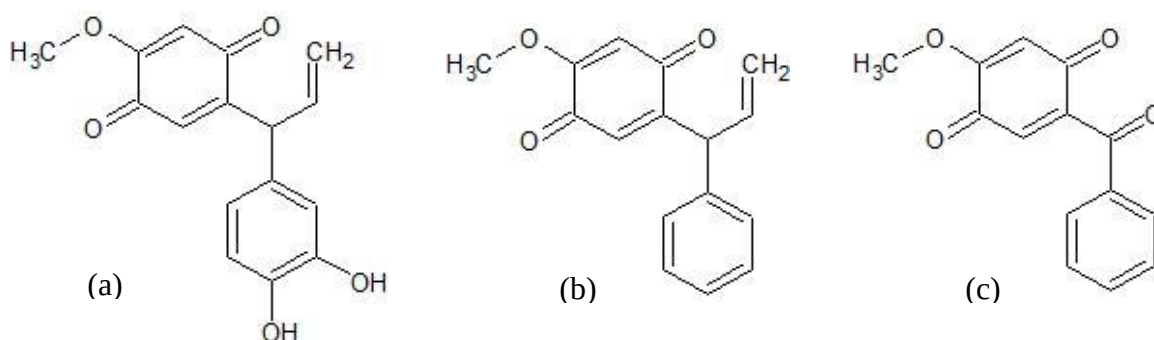
Figura 01 - Estruturas da Pinocembrina (a); Galangina (b); Ester feniletil do ácido caféico (c)



Elaborado pelo autor.

A própolis tem demonstrado ação anti-inflamatória por inibir a síntese das prostaglandinas, ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (KOSALEC et al., 2005). A própolis possui grupos fenólicos que agem diretamente nos mediadores da inflamação por meio da captura de radicais livres (WANG et al., 2014). Flavonoides isolados da própolis foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir genes inflamatórios, 3,4-di-hidroxi-4-metoxialergiozina, 4-metoxidalbergion, ceraroína e crisina, suas estruturas estão representadas na figura 02 – (a), (b) e (c) respectivamente, sua ação se dá pela inibição da ativação induzida da interleucina nuclear, portanto estes quatro flavonoides são responsáveis pela ação anti-inflamatória da própolis (FUNAKOSHI-TAGO, et al. 2015).

Figura 02 - Estruturas da 3,4-di-hidroxi-4-metoxialergiozina (a); 4-metoxidalbergion (b); ceraroína (c)



Elaborado pelo autor.

“No processo de reconstrução e cicatrização das feridas, as pesquisas aprofundam-se nos aspectos biológicos e bioquímicos que ocorrem durante este processo com objetivo de acelerar seu desenvolvimento” (BASTOS 2011). Esta atividade biológica está relacionada propriamente as flavonas, especificamente os glucosídeos que aparecem na própolis em forma de agluconas livres e os metoxiflavonóides. Considera-se que este mecanismo de ação está baseado na intervenção destes compostos no nível dos mediadores da inflamação (VERONESE, 2010).

Em um estudo realizado comparando as propriedades cicatrizantes de um creme de própolis com a sulfadiazina de prata, foi demonstrado que os ferimentos

tratados com própolis cicatrizaram mais rapidamente e apresentaram menos inflamação do que aqueles tratados com sulfadiazina de prata (GREGORY et al., 2002).

A ação regenerativa de cartilagem e ossos, através do estímulo na proliferação de condrócitos que promovem também propriedades de regeneração tecidual como cicatrização de úlceras, feridas e hepatoproteção, possivelmente estão relacionadas com a atividade antioxidativa da própolis. Quando os radicais livres são produzidos, eles dificultam ou mesmo impedem que ocorra a regeneração das células no local. A remoção dos radicais livres pelos flavonoides da própolis permitiria que o órgão ou tecido doente possa se regenerar normalmente (CARDILE *et al.*, 2003).

Avaliações da atividade cicatrizante da própolis foi realizada em camundongos, nos animais foram feitos ferimentos e infectados com *Staphylococcus aureus*, os ferimentos tratados com soluções hidroalcoólicas de própolis mostraram uma diminuição no tempo de cicatrização, de forma dose dependente que influenciou a leucocitose e linfocitose com aumento de proteínas da fração hemoglobínica (BATISTA et al., 2015).

Empregando a própolis na área terapêutica medicamentosa para tratamento de regeneração tissular em úlceras crônicas e comparando com tratamentos clássicos, foi constatado que a própolis foi responsável pela melhora no aspecto da lesão promovendo diminuição nas medidas dos ferimentos, odor, microrganismo, chegando a negatificação e um aumento na limpeza dos ferimentos. (BERNARDO, et al. 1990).

A própolis possui compostos como eugenol (a), isolugenol, metileugenol (b) estrutura representada abaixo na figura 05, e seus efeitos anestésicos são superiores em comparação aos anestésicos normalmente conhecidos como a cocaína e novocaína (VERONESE, et al., 2010).

Figura 03 - Estrutura do Eugenol (a); Metileugenol (b)



Elaborado pelo autor.

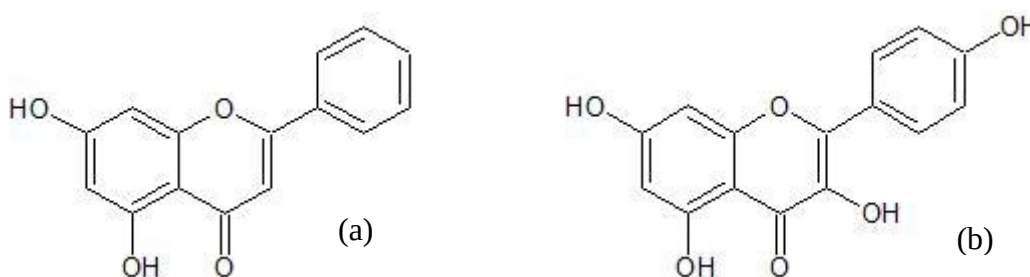
Atribuindo as diversas capacidades dos flavonoides presentes na própolis dentre elas é a de inibir germinação de esporos de patógenos de plantas, o seu uso tem sido proposto contra fungos patógenos do homem (HARBORNE, 2000). Trabalho realizado por Oliveira (et al., 2006) demonstraram que a própolis possui excelentes atividades fungistática e fungicida, em testes *in vitro* contra leveduras identificadas como causadores de onicomicoses como a *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* entre outras, baixas concentrações de própolis foram suficientes para estimular a morte celular.

A atividade fungicida foi testada contra leveduras isoladas de onicomicose que é uma infecção causada por fungos que se alimentam da queratina, observou-se que o extrato etanólico da própolis mesmo em pequenas quantidades foram promissoras em inibir o crescimento de fungos, este resultado está relacionado ao teor de flavonoides presentes na composição da própolis (LONGUINI, et al. 2007). Utilizando o extrato etanólico de própolis em concentração de 0,2 a 1,6 mg/mL contra *C. neoformans*, foi constatado que em todas as concentrações houve inibição do crescimento do fungo e na concentração de 1,6 mg/mL verificou-se o efeito fungistático (FERNANDES, et al. 2007).

Dentre as propriedades biológicas da própolis destaca-se a atividade antiviral, cultivos celulares foram infectados com Calicivírus felino, Adenovírus canino e vírus da diarreia viral bovina, extrato de própolis foi adicionado antes e depois da inoculação do vírus, foi constatado que a própolis adicionada antes da inoculação evidencia uma maior atividade antiviral, essa provável ação biológica é devido à presença dos flavonoides: rutina, quercetina, e ácido gálico (CUETO, et al. 2011).

Os flavonoides encontrados na composição da própolis, crisina e kaempferol, estruturas representadas na figura 03 – (a) e (b) respectivamente, são responsáveis por inibir a replicação viral HSV, coronavírus humano e retrovírus. Mais recentemente, o flavonol galangina foi relatado ter significativa atividade antiviral contra o HSV e o vírus coxsackie B (CUSHNIE, et al., 2005).

Figura 04 - Estruturas da Crisina (a) e Kaempferol (b)

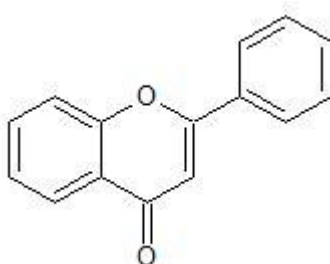


Elaborado pelo autor.

A atividade antiviral da própolis foi avaliada em estudos *in vitro*, os resultados *sugeriram* que a própolis tem uma potente inibição contra as variantes X4 e R5 do vírus HIV-1. Atividade similar foi observada com linfócitos CD4+ operando, pelo menos em parte, como inibidor da entrada viral (GEKKER et al., 2005).

Li et al. (2000) “demonstrou a inibição de HIV-1 dentro de células que expressam CD4, quimiocinas co-receptoras e antagonismo da transcriptase reversa HIV-1 pela flavona”. Sua estrutura está na figura 04 logo abaixo.

Figura 05 - Estrutura da flavona



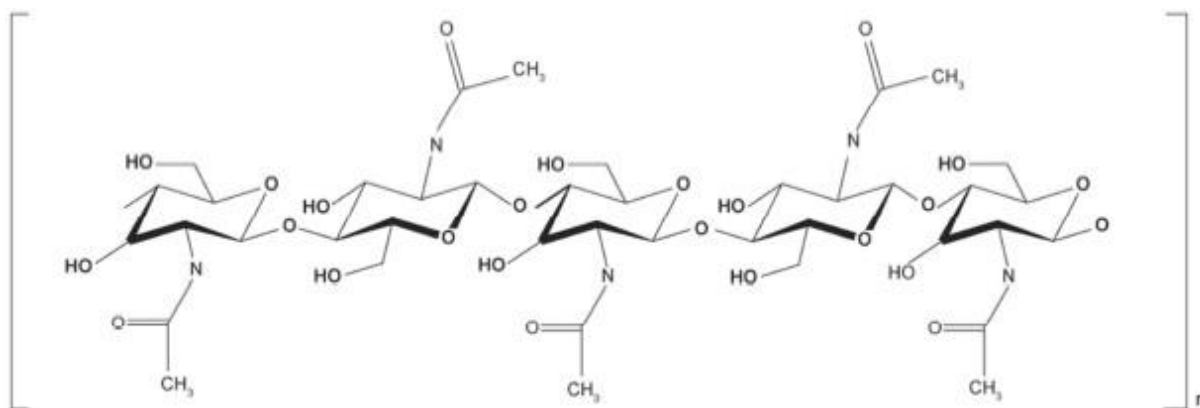
Elaborada pelo autor.

2.3 Quitosana

A quitosana é um produto seminatural, de simples obtenção, renovável e biodegradável, de grande importância econômica e ambiental. A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação em meio alcalino. A quitina pode ser encontrada na carapaça de crustáceos e também naturalmente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (SILVA et al., 2006).

Tanto a quitina como a quitosana são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ onde ocorreu a ligação entre dois monossacarídeos em uma reação de condensação entretanto a quitina e a quitosana diferem-se quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade (AZEVEDO, 2007).

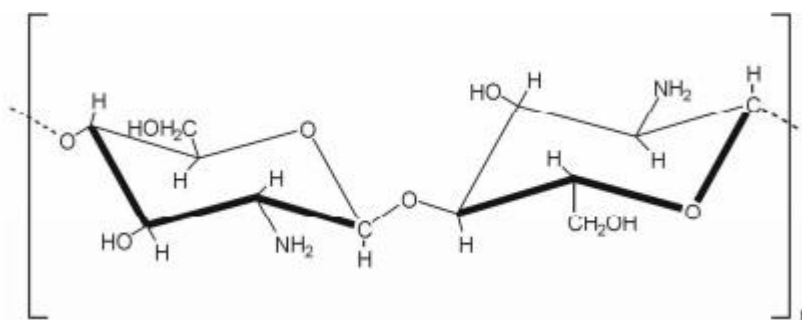
Figura 06 - Estrutura da quitina



Fonte: Adaptado de Borgognoni et al., 2006.

Na reação de desacetilação da quitina, os grupos acetamida são convertidos em grupos amino por meio da hidrólise, resultando em uma estrutura formada pela repetição das unidades 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e N-acetil-2-deoxi-D-glicopiranosose, as unidades são unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares (ZARGAR et al., 2015).

Figura 07 - Estrutura da quitosana



Fonte: Janegitz et al., 2007.

2.4 Aplicações da quitosana

Uma das aplicações da quitosana é a produção do n-Lauril-carboximetilquitosano um anfifílico polímero que forma micelas que solubilizam o taxol, tornando-o mais eficaz terapeuticamente, e é encontrado para ser seguro em termos de toxicidade de membrana. Este tipo de derivado é geralmente útil como portador para drogas hidrofóbicas cancerosas (RINAUDO, 2006).

Algumas das principais áreas de aplicação da quitosana são: agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), tratamento de água (floculante para clarificação, remoção de íons metálicos, polímero ecológico e redução de odores), indústria alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante para molhos, fungicida e bactericida, recobrimento de frutas), indústria de cosméticos (esfoliante para a pele, tratamento de acne, hidratante capilar, creme dental) e biofarmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante). Porém sua maior aplicação é na área biomédica (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada de drogas em animais e humanos, encapsulamento de materiais) (RINAUDO et al., 2006).

Na Indústria Farmacêutica e biomédica, a quitosana também é produto bastante atrativo, uma vez que é biodegradável, renovável, biocompatível e de baixa toxicidade ao ser humano. O produto vem sendo empregado para liberação de fármacos promovidos pela membrana para a cicatrização de ferimentos e lesões na pele e também para regeneração de tecidos principalmente o ósseo, atuando como uma alternativa à enxertia, pois o organismo apresenta uma mínima rejeição (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

A atividade antimicrobiana é uma das características que se destacam nas propriedades biológicas da quitosana. Esses polímeros provocam a inibição do crescimento de microrganismos, como *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis*⁴⁰, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Coliforms*, *Vibrio*³, *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganense*, *Erwinia sp.*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum*⁴¹ e *Candida*⁴² (COSTA SILVA et al., 2006).

“Estudos realizados, revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo” (SILVA et al., 2006). Zheng e Zhu demonstraram que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas aumenta proporcionalmente a quanto for maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias gram-negativas, quanto menor a massa molecular da quitosana, maior a atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2006).

Okamoto et al., 2003 e colaboradores ressaltam que esses polímeros reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana (tempo de coagulação sanguínea de 3,7 min) mais eficaz que a quitina (tempo de coagulação sanguínea de 4,7 min) na coagulação sanguínea sob a mesma concentração de 0,1 mg/mL (tempo de coagulação sanguínea de 12 min para o controle), embora a quitina tenha maior capacidade em agregar plaquetas (61,2%) que a quitosana (27,9%).

Em relação as diversas aplicações de quitosana e seus derivados na área farmacêutica, observa-se que essas se concentram principalmente na elaboração de dispositivos para a liberação controlada de fármacos e na engenharia de tecidos, mas também são descritas aplicações em vacinas e como agentes antimicrobianos (FILHO et al., 2007).

Estudos realizados por Okamoto sugerem que o principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios, ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ . Por conclusão a quitosana teria a propriedade de absorver a bradicinina liberada na região da inflamação e a quitina,

capacidade de absorção quase três vezes maior que está. (OKOMOTO et al., 2003).

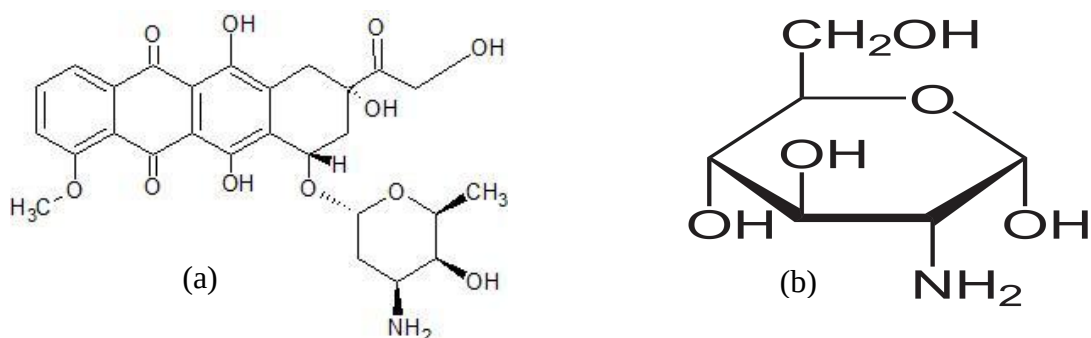
Micro-grânulos de quitosana entrecruzada com glutaraldeído, utilizadas para a liberação do diclofenaco de sódio, apresentaram capacidade de liberar o fármaco dependente do pH. Em meio ácido os micro-grânulos hidrolisam, sendo assim esse sistema de liberação controlada é adequado para ambientes característicos como o estomago (GUPTA et al., 2000).

A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago e sua função de cicatrização de ferimentos e a biodegradabilidade no organismo é explicada por este mecanismo de ação (SILVA et al., 2006).

Estas propriedades estão sendo exploradas no desenvolvimento de biomateriais comerciáveis para tratamento de feridas. No Japão, já se encontra disponível pele artificial de quitina, que pode ser aplicada em casos de queimaduras superficiais, profundas e de terceiro grau, além de lesões traumáticas e abrasivas, promovendo hemostasia, analgesia e aceleração da epitelização (COSTA SILVA et al., 2006).

Doxorubicina e seus derivados bioativos são utilizados na terapia de tratamento de câncer, porém a eficácia é limitada devido à toxicidade do fármaco. Uma forma de resolver esse problema é utilizar, por exemplo, nanopartículas de quitosana como um sistema de liberação controlada desse fármaco. Sua estrutura está representada na figura 09 abaixo. (FILHO et al., 2007).

Figura 08 - Estrutura da doxorubicina (a) e glicosamina (b)



Elaborado pelo autor.

Glicosamina estimula a biossíntese de peptideoglicanos e estes auxiliam na manutenção estrutural do tecido conjuntivo, agindo como estabilizadores de membrana, diminuindo a geração de radicais superóxidos e inibindo enzimas lisossômicas. Sua estrutura está representada na figura 10 acima. (MUZZARELLI et al., 2000).

Dallan et al. (2005) cita que em razão da capacidade da quitosana em formar filmes e membranas em soluções ácidas diluídas, diversas aplicações que exploram esta propriedade vêm sendo estudadas. Segundo Mi et al. (2000), membranas assimétricas de quitosana são capazes de apresentar excelente permeabilidade ao oxigênio, controlar a perda de água por evaporação e promover a drenagem de exsudato das lesões.

Em testes realizados com modelos animais, a quitosana mostrou ter relevância nos processos em todos os estágios de cicatrização do tecido, processo este considerado complexo, envolvendo vários mecanismos como coagulação, inflamação, síntese e deposição de matriz celular, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelagem (ALEMDAROGLU et al., 2006).

Tharanathan e Prashanth (2007) realizaram uma ampla pesquisa sobre a quitina e a quitosana, investigando suas modificações e aplicações. Neste estudo foi comprovado que as áreas de aplicações da quitina/quitosana e seus derivados são quase ilimitados, levando em conta que estes podem ser obtidos na forma de fibras, microesferas e nanopartículas. São mencionadas aplicações na área de alimentos e nutrição, ciência dos materiais, ciências médicas e farmacêuticas, microbiologia, imunologia.

2.5 Quitosana e própolis

Nanopartículas de quitosana e extrato etanólico de própolis foram incorporadas em pastas de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) para avaliar sua ação bacteriana contra *Enterococcus faecalis* que foram inoculadas em canal radicular humano, a pasta foi capaz de reduzir significativamente colônias de *E. faecalis* proporcionando ser um potencial medicamento para intracanaís (CARPIO-

PEROCHENA et al., 2017).

Foi desenvolvida uma combinação de própolis e quitosana para um material de embalagens de papel a base de celulose ativa para alimentos, os resultados mostraram que a embalagem possui resistência a umidade e quando em contato com alimentos úmidos são liberados polifenóis ativos tendo assim atividade antimicrobiana e se tornando interessante para o setor de embalagens de alimentos (ROLLINI et al., 2017).

Foi constatado a eficácia antibacteriana em filmes de polipropileno revestidos de quitosana incorporadas com extrato etanólico de própolis, sua atividade bacteriana foi avaliada contra patógenos de origem alimentar como *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. Os filmes formados apresentaram atividade contra todos os patógenos, portanto, possui uma aplicação para embalagens de alimentos. (TORLAKA, SERTB, 2013).

No intuito de melhorar a solubilidade, liberação controlada e atividade anticancerígena de nanopartículas de própolis, foi incorporado micropartículas de quitosana, os resultados demonstraram um considerável aumento na solubilidade da própolis com perfil de liberação controlada em diferentes ambientes, aumento na eficiência terapêutica três vezes maior que a própolis livre (ELBAZ, et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar membranas de quitosana com própolis

3.1.1 Objetivos específicos

- a) Analisar a superfície das membranas de quitosana com extrato alcoólico por microscopia eletrônica de varredura.
- b) Estudar o perfil da molhabilidade das membranas
- c) Determinar a toxicidade do extrato alcoólico de própolis

4. METODOLOGIA

O trabalho foi dividido em três etapas. A primeira foi a pesquisa e revisão da literatura sobre membranas de quitosana e própolis. A segunda etapa foi a preparação das membranas de quitosana com própolis. A terceira se constitui na caracterização das membranas por: análise de superfície, molhabilidade, energia de superfície e toxicidade.

4.1 Materiais utilizados

4.1.1 Reagentes

Para a obtenção das membranas foram utilizados os seguintes reagentes, de qualidade analítica certificada: quitosana 85% desacetilada (POLYMAR, LTDA) ácido acético glacial, hidróxido de sódio, extrato etanolico de própolis das industrias Mel Wenzel.

4.2 Métodos.

4.2.1 Preparação de membranas de quitosana

Para a produção das membranas de quitosana pura foi dissolvida o pó da quitosana em ácido acético 2% e deixado por 24 horas em agitação constante, após 24 horas a solução foi filtrada em filtro de nylon e em seguida em um filtro de *Mille Millipore*. Após a filtragem verteu-se a solução para as placas de Petri, e as mesmas foram a estufa durante 24 horas a 50°C.

As membranas formadas foram neutralizadas com uma solução de hidróxido de sódio, lavadas com água destilada e estiradas para secagem em temperatura ambiente por 24h. Para membranas de quitosana com própolis foi adicionado o extrato etanolico de própolis a solução das membranas antes de ir para a estufa, com proporções de própolis a 2,85%, 4% e 15% para soluções de 35 ml.

4.2.2 Análise de superfície

A análise da topografia superficial foi realizada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), marca SHIMADZU modelo SSX-550 representado na figura 10, com detectores de elétrons secundário (SE) e elétrons retro-espalhados (BSE) que permite a diferenciação de regiões da amostra segundo o número atômico dos elementos presentes, o procedimento foi desenvolvido no LABMAT - Instituto Federal do Piauí (IFPI) Campus Teresina central, as amostras foram revestidas com ouro e foi utilizado o método SE para adquirir as imagens da superfície com aproximações de 100 vezes.

Figura 09 - MEV SHIMADZU modelo SSX-550



Elaborado pelo autor.

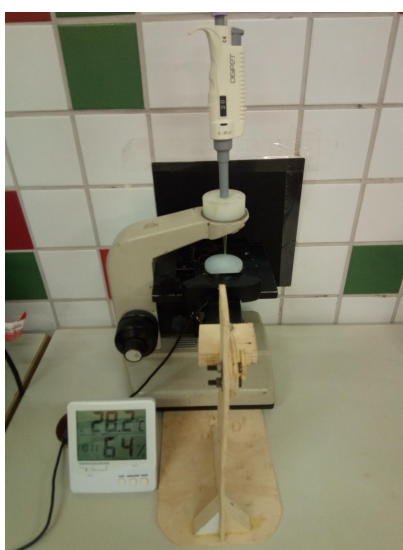
4.2.3 Análise de molhabilidade

No teste de molhabilidade foi utilizado o método da gota séssil pelo aparelho Goniômetro, representado na figura 11, onde foi gotejado na superfície da amostra uma gota de cada solvente, água destilada, formamida e glicerina, este procedimento foi desenvolvido no laboratório de física do Instituto Federal do Piauí/ Campus Picos.

Uma amostra da membrana de quitosana foi colocada na base do aparelho

em seguida é gotejou-se 20 μ l na superfície da membrana, o procedimento é registrado em um computador pelo *software Movie Maker*, os vídeos foram gravados separadamente para cada solvente e tem duração de 60 segundos, posteriormente os mesmos passaram por um processo de análise onde foi tirado prints dos vídeos em escalas intercaladas: 00s, 10s, 20s, 30s, 40, 50s, 60s e obtido 7 imagens de cada vídeo.

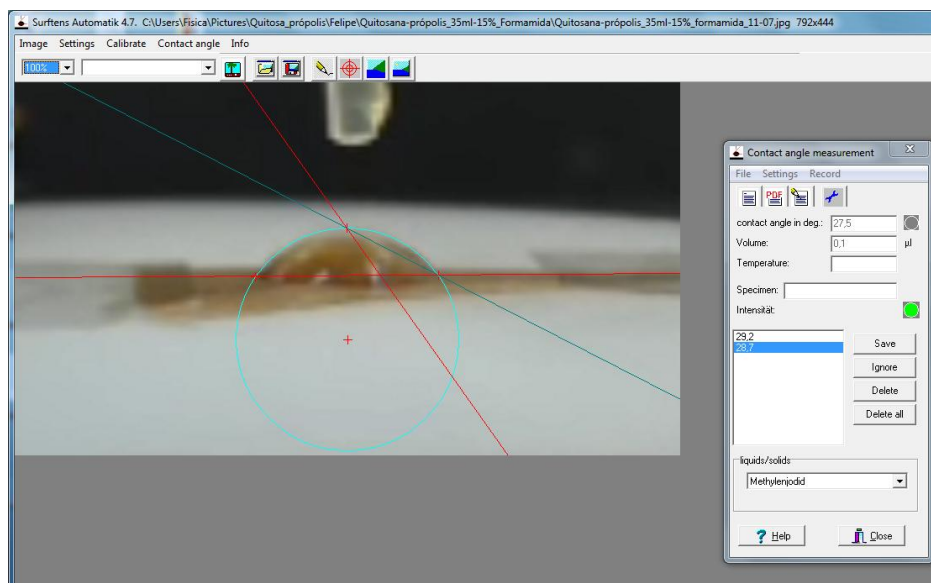
Figura 10 - Goniômetro



Elaborado pelo autor.

Após esse processo as imagens foram analisadas no *software Surftens* versão 4.7 demo, foi feito 3 marcações em volta da gota onde gera-se um círculo para obter a tangente da gota baseado na absorção da membrana.

Figura 11 - Interface do Programa Surfens formação do círculo e sua respectiva tangente para obtenção do ângulo de contato



Elaborado pelo autor.

4.2.4 Energia de superfície

Calculou-se a energia de superfície utilizando a equação de Fowkes. Para tanto, foram utilizados os valores dos ângulos de contato medidos anteriormente e os valores das componentes polar e dispersiva de cada um dos líquidos, estes dados são apresentados no gráfico 2.

Figura 12 - Equação de Fowkes

$$\left[\frac{1 + \cos \theta}{2} \right] \times \left[\frac{\gamma_l}{\sqrt{\gamma_l^d}} \right] = \sqrt{\gamma_s^p} \times \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}} + \sqrt{\gamma_s^d}$$

Elaborado pelo autor.

A tensão superficial é também apresentada como a força aplicada para formar uma unidade de comprimento de superfície. E a superfície é apresentada como uma membrana ou filme superficial elástico que reveste, ou separa, o líquido. Este filme é mantido esticado pela tensão superficial (ESTATÍSTICA DE FLUÍDOS 2018).

4.2.5 Teste de toxicidade

4.2.5.1 *Allium cepa*

O teste *A. cepa* foi realizado no Laboratório de Pesquisa I da Universidade Federal do Piauí. Os bulbos utilizados eram de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis. Os parênquimas centrais das coroas de brotamento foram retirados e em seguida os bulbos de cebola foram colocados em frascos com água destilada, a temperatura ambiente, para enraizar. Os bulbos com as raízes até 2 cm de comprimento foram colocados nas soluções de tratamento com Própolis a 15% diluído em água destilada.

Para verificar a atividade citotóxica e mutagênica da própolis nessa porcentagem, foram realizados 01 tratamento com cinco repetições (bulbos), além de um controle negativo (CN) feito com água destilada e um controle positivo (CP) utilizando sulfato de cobre (6 µg/mL). Após os períodos de exposição (24 e 48h), as pontas das raízes (meristemas) foram removidas e fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético) por 6-8 h, à temperatura ambiente, e estocadas a -20° C, até o momento de confecção das lâminas. Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada de 5 min cada e hidrolisadas (HCl 1N, 10 min.). Após a hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada e transferidas para frascos de vidro âmbar, contendo o Reativo de Schiff, onde permaneceram em local escuro, por 2 h. Após esse período, as raízes foram lavadas, até a total retirada do reativo, transferidas para lâminas, onde foram esmagadas em uma gota de carmim acético 2%. As lâminas foram avaliadas, utilizando o microscópio óptico (400 x). Foram avaliadas 1000 células por repetição, totalizando 5.000 células por tratamento.

A citotoxicidade (Índice Mitótico, IM) e a genotoxicidade (alterações cromossômicas, AC) da própolis a 15% foram avaliadas pela contagem de 5.000 células meristemáticas (unidade experimental: 1000 células/ lâmina; total de 5 lâminas por tratamento) em microscópio de luz DM 500 (400 x). O IM foi calculado utilizando a seguinte fórmula: n° de células em divisão dividido pelo n° total de células analisadas e multiplicado por 100. A genotoxicidade inclui alterações

resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfase com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, metáfases poliploides, e outras alterações) ou efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos, pontes cromossômicas e outras alterações). Adicionalmente, a presença ou não de MN, os quais podem ser resultantes de efeitos aneugênicos ou clastogênicos, também foi avaliada juntamente com as outras alterações cromossômicas (MAZZEO, 2009).

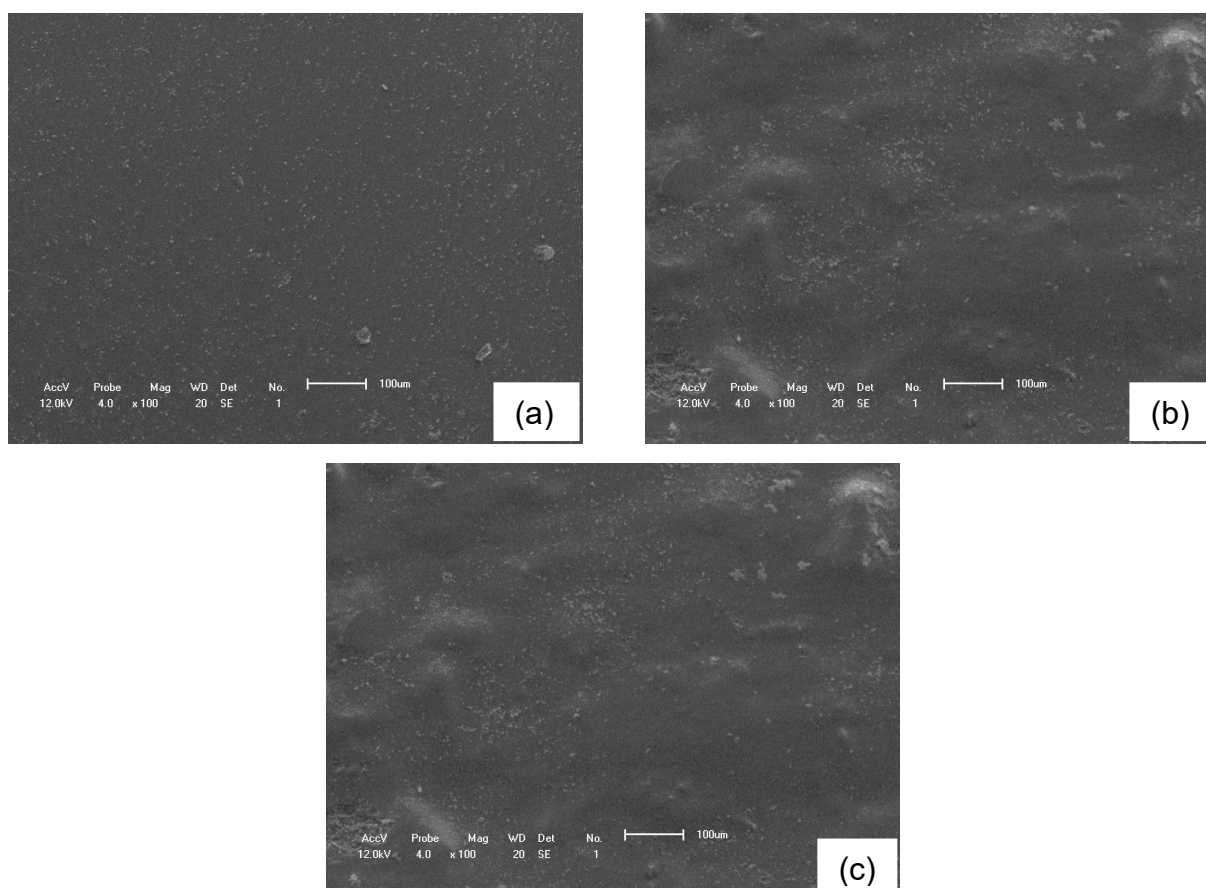
A análise dos resultados foi realizada pela análise de variância One-way e Two-way (ANOVA) seguido do pós teste Tukey como Post hoc teste, utilizando o programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego Califórnia U.). O valor de $p < 0,01$ foi utilizado como valor de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica das membranas puras e à base de própolis, a 2,85%, 4% e 15%, podem ser visualizadas nas figuras abaixo pura (a); 2,85% (b) e 4% (c) aproximadas 100x.

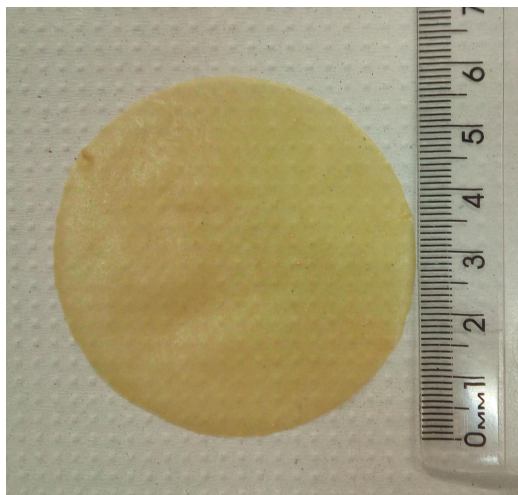
Figura 13 - Microscopia eletrônica da superfície das membranas de quitosana e própolis, membrana pura (a); 2,85% (b); 4% (c)



Elaborado pelo autor.

Observa-se nas imagens de microscopia eletrônica que as membranas de quitosana pura apresenta uma superfície homogênea, ausência de poros, sem vales e sem danos. As membranas que contêm própolis apresentaram pequenas formações de vales ao longo de sua extensão.

Figura 14 - Membrana de quitosana



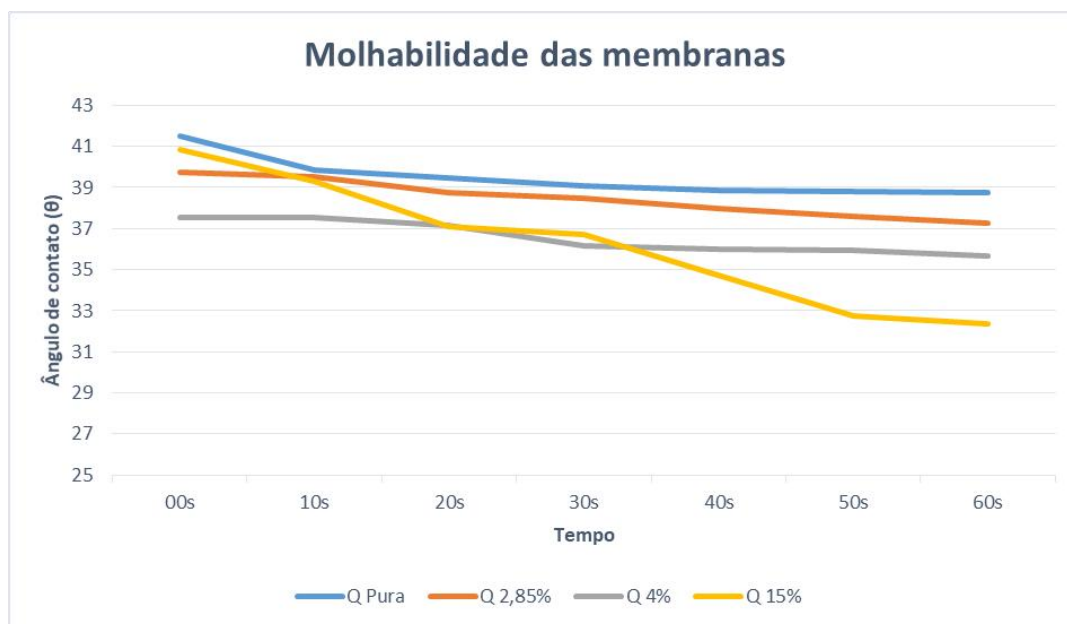
Elaborado pelo autor.

Fazendo-se uma análise comparativa entre as morfologias das membranas não foram observadas diferenças significativas nas superfícies das membranas de quitosana pura e com própolis, a adição de própolis trouxe apenas uma pequena alteração a morfologia das membranas.

5.2 Análise de molhabilidade

No gráfico pode-se observar os valores dos ângulos de contato medidos a partir da técnica da gota séssil de água destilada sobre superfícies das amostras de quitosana pura (Q1), quitosana própolis a 2,8% (Q 2,8%), quitosana própolis 4% (Q 4%) e quitosana própolis 15% (Q 15%). Em todos os tratamentos ocorreu uma diminuição dos ângulos de contato tendendo a uma estabilidade.

Gráfico 01 – Dinâmica entre o ângulo de contato de membrana pura e com própolis a 2,85, 4 e 15%.



Elaborado pelo autor.

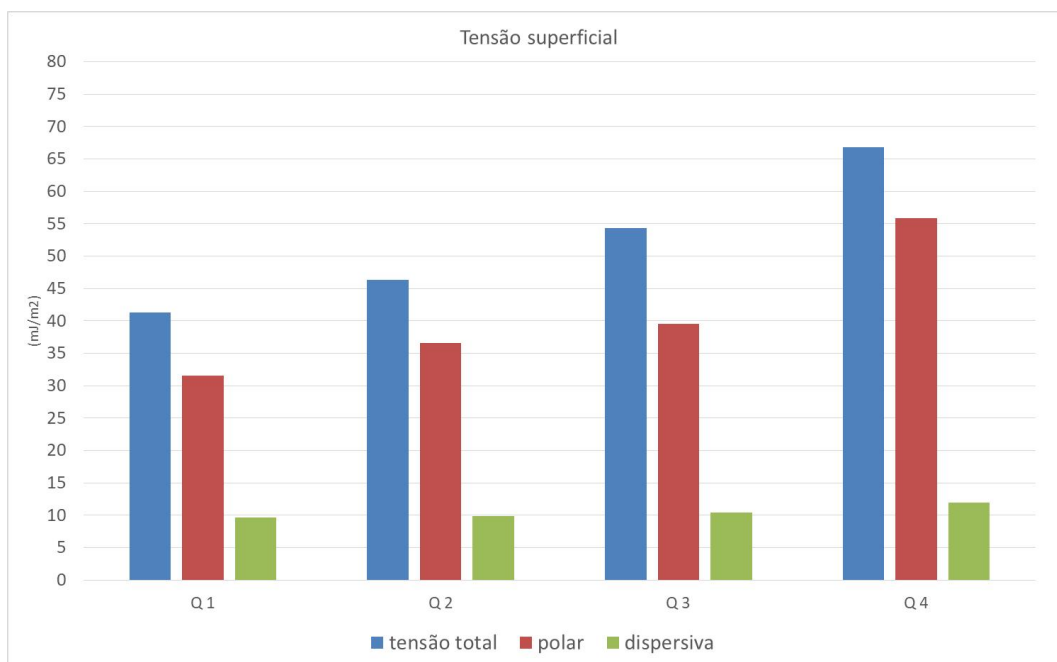
Pode-se observar que as membranas tiveram a sua hidrofiliabilidade aumentada proporcional a porcentagem de própolis adicionada a membrana, o extrato alcoólico da própolis é uma substância solúvel em água isso se dá a grande quantidade de grupos polares presentes em sua composição.

A hidrofiliabilidade é um dos fatores que afetam a citocompatibilidade dos biomateriais. A adesão e crescimento celular nas superfícies são considerados como sendo fortemente influenciados pelo balanço hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, frequentemente descritos como molhabilidade (ESPOSITO et. al. 2007).

5.3 Energia de superfície

A tensão superficial é um efeito físico que ocorre na interface entre duas fases químicas, isto faz com que os átomos da superfície tenham, em média, maior coesão do que no interior. Assim, a superfície de um líquido pode ser compreendida como uma fina película que reveste toda sua extensão.

Gráfico 02 - Energia superficial das membranas de quitosana pura e com própolis.



Elaborado pelo autor.

Analizando o gráfico a quitosana pura (Q1), quitosana/própolis 2,85% (Q 2), quitosana/própolis 4% (Q 3) e quitosana/própolis 15% (Q 4). A membrana pura em relação as membranas de quitosana com o extrato etanolico de própolis, observa-se que houve um aumento na polaridade proporcional a porcentagem de própolis adicionado a membrana de quitosana, a polaridade é proporcional a tensão superficial total, ou seja, à medida que a polaridade aumenta a energia de superfície aumenta fazendo assim com que o líquido sofra uma maior absorção.

A energia de superfície é um indicador da química da superfície, em termos das interações que podem ocorrer. Sabe-se que a energia de superfície afeta fortemente as interações biológicas, tais como a adesão, proliferação e a morfologia celular (PONSONNET et. al. 2002). A componente dispersiva da energia de superfície é uma ferramenta útil para acompanhar as mudanças nas camadas externa, é observado que a componente dispersiva não sofreu grandes alterações concluindo que a química da superfície não teve mudanças significativas.

O ângulo de contato de um material tem forte relação com a energia superficial. Um líquido como a água tende a se espalhar sobre uma superfície com

alta energia superficial e por outro lado formar gotas sobre uma superfície de baixa energia superficial (SHIRTCLIFE et al., 2010).

Quando uma gota de água é gentilmente colocada sobre uma superfície sólida, um de três comportamentos pode ocorrer, A gota se espalha continuamente sobre a superfície, formando uma película cada vez menos espessa; a gota se espalha até certo ponto, tomando a forma de uma calota; a gota se contrai, tentando assumir o formato esférico.

5.4 Teste de toxicidade

5.4.1 *Allium cepa*

O sistema de teste de *Allium cepa* é bem aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade para soluções aquosas de própolis, as raízes ficam em contato direto com a substância, permitindo a avaliação de concentrações diferentes. As alterações cromossômicas e a divisão celular meristemáticas da raiz da cebola são frequentemente utilizadas para determinar a toxicidade da substância.

Após um período de 24 horas as raízes selecionadas dos bulbos foram remedidas, a tabela abaixo relaciona a média de crescimento.

Tabela 01 - Raízes dos bulbos de *allium cepa*

	00h	24h	48h
Bulbo 1	Cm das raízes	Cm das raízes	Cm das raízes
R1	0,8	0,8	-
R2	1,0	1,0	1,0
R3	0,5	0,5	0,7
Bulbo 2			
R1	0,6	0,6	0,6
R2	0,7	-	-
R3	0,9	0,9	0,9
Bulbo 3			
R1	0,9	0,9	0,9
R2	0,6	0,6	0,6
R3	0,9	0,9	0,9

Elaborado pelo autor.

Na medida do comprimento em 24h as raízes não sofreram crescimento e a raiz 2 (R 2) quebrou, no tempo de 48h no bulbo 1 a raiz 1 quebrou e a raiz 3 (R 3) teve um crescimento de 0,2 cm, as demais não sofreram alterações.

A nível celular, a concentração da própolis avaliada não apresentou efeitos citotóxicos, como observado pela não redução significativa do IM do mesmo ($49,9 \pm 3,3$; $50,9 \pm 3,3$) quando comparado com o controle negativo ($56,2 \pm 3,2$; $56,6 \pm 2,6$) para os 02 tempos de exposições (TE) analisados, respectivamente. A análise estatística de cada fase do ciclo celular comprovou que realmente a substância avaliada não interfere na dinâmica da divisão celular como pode ser observado quando se compara ao controle negativo (CN) para os 02 TE. O controle positivo interferiu significativamente na divisão celular para os 02 TE como era esperado, porém a própolis quando comparado ao CP se mostrou estatisticamente diferente ao mesmo, ratificando sua não citotoxicidade. Além de não ser citotóxico, a própolis também não foi mutagênica ($1,6 \pm 2,0$; $2,0 \pm 0,1$) para as células meristemáticas

avaliadas nos 02 TE analisados, respectivamente, como observado pelos valores não significantes quando comparados com o CN ($2,0 \pm 0,1$; $1,6 \pm 1,1$) (Tabela 2).

Tabela 02 - Avaliação do efeito citotóxico e mutagênico da própolis a 15% em células meristemáticas de *Allium cepa*.

Tratamento	Concentração	TE (h)	Fases do ciclo celular					IM (%)	AC
			Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase		
CN	-	24h	443,0 $\pm$ 19,1	450,6 $\pm$ 13,5	47,6 $\pm$ 4,1	30,0 $\pm$ 2,6	28,6 $\pm$ 2,5	56,2 $\pm$ 3,2	2,0 $\pm$ 0,1
CP	6 μ g/mL		887,3 $\pm$ 8,0 ^a	53,6 $\pm$ 7,0 ^a	29,6 $\pm$ 4,7 ^a	18,3 $\pm$ 1,1 ^a	12,3 $\pm$ 1,5	11,4 $\pm$ 0,7 ^a	31,3 $\pm$ 2,3 ^a
Própolis	15%		500,6 $\pm$ 23,0 ^b	434,0 $\pm$ 11,5 ^b	35,6 $\pm$ 8,1	18,0 $\pm$ 7,2	11,6 $\pm$ 2,8	49,9 $\pm$ 3,3 ^b	1,6 $\pm$ 2,0 ^b
CN	-	48h	427,6 $\pm$ 22,5	481,3 $\pm$ 34,6	42,3 $\pm$ 10,0	24,6 $\pm$ 9,0	24,0 $\pm$ 8,5	56,6 $\pm$ 2,6	1,6 $\pm$ 1,1
CP	6 μ g/mL		860,0 $\pm$ 3,4 ^a	73,0 $\pm$ 5,3 ^a	30,0 $\pm$ 6,9	21,0 $\pm$ 5,1	16,0 $\pm$ 1,7	14,6 $\pm$ 3,0 ^a	37,0 $\pm$ 4,3 ^a
Própolis	15%		496,3 $\pm$ 22,5 ^b	428,3 $\pm$ 24,2 ^b	40,0 $\pm$ 4,5	26,6 $\pm$ 5,7	14,6 $\pm$ 5,0	50,9 $\pm$ 3,3 ^b	2,0 $\pm$ 0,1 ^b

CN: Controle negativo (Água destilada). **CP:** Controle positivo (CuSO₄: Sulfato de cobre). **TE:** Tempo de exposição. **IM:** Índice Mitótico. **AC:** Alterações cromossômicas. One-way ANOVA para IM e AC e Two-way ANOVA para fases do ciclo celular com pós-teste de Tukey. Valores de significância ($p < 0,01$), ^acomparado ao CN; ^bcomparado ao CP. ($p < 0,01$).

6 CONCLUSÃO

Foi possível obter e caracterizar as membranas de quitosana com extrato alcoólico de própolis. A adição de própolis a membrana não trouxe alteração a sua morfologia. Entretanto as membranas com extrato de própolis tiveram um aumento da hidrofiliabilidade, devido ao aumento da componente polar, observado no ensaio de energia de superfície. As proporções de extrato alcoólico de própolis utilizadas não apresentaram toxicidade.

Com os resultados obtidos as membranas de quitosana/própolis apresentaram um produto de grande potencial para aplicações no ramo da biomedicina com características adequadas para utilização como biomateriais.

REFERÊNCIAS

- ALEMDAROGLU, C. Zelihagül Değim', Nevin Çelebi, Fatih Zor, Serdar Öztürk, Deniz Erdoğan. An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor. *Burns*, n.32, p. 319–327, 2006.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, M. V. L.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, N. 2.3, p. 27-34, 2007.
- BASTOS, E. M. A. F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E. M.; Scoaris. D.O.; Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 63, n.5, p.1255-1259, 2011.
- BATISTA, E. K. F. et al. Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. *Rev. bras. Plantas med.*, Botucatu , v. 17, n. 3, p. 413-419, set. 2015 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722015000300413&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 09 maio 2018.
- BERNARDO, C. L. E.; SOUZA I. A. F.; COLAVITTI, C.; GARCIA, C. Própolis: cicatrizante e antibiótico natural. *Rev. bras. enferm.*, Brasília , v. 43, n. 1-2-3-4, p. 101-106, dez. 1990 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003471671990000100016&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 09 maio 2018.
- CARDILE V.; PANICO, A.; GENTILE, B.; BORRELLI, F.; RUSSO, A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*. v. 73, p. 1027-1035, July 2003.
- CARPIO-PEROCHENA, A.; KISHEN, A.; FELITTI, R.; BHAGIRATH, A. Y.; MEDAPATI, M. R.; LAI, C.; CUNHA, R. S.; Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single - and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *American Association of Endodontists*. Canada. N. 43(8), p. 1332-1336, 2017.
- CUETO, A. P.; HARTZ, A. S.; PILAU, M.; WEIBLEN, R.; KUBIÇA, T. F.; LOVATO, L. T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. *Ciência Rural*. 2011, 41 (Outubro-Sin mes) : [Fecha de consulta: 8 de mayo de 2018] Disponível em :<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33119857015>>

CUSHNIE T. P. T., LAMB A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. of Antimicrob. Agents*, v.26, n.5, p.343- 356, nov. 2005.

DALLAN, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. 2005. Tese (Doutorado em engenharia química) – Faculdade de engenharia química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas São Paulo, 2005.

ELBAZ, N. M.; KHALIL, I. A.; RABOU, A. A.; EL-SHERBINY, I. M. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 92, p. 254-269, 2016.

ESPOSITO, A. R.; LUCCHESI, C.; FERREIRA, B. M.P.; DUEK, E. A. R. Estudo da interação células vero/PLGA após a modificação da superfície por plasma de oxigênio. *Rev. Mat.* v. 12, n.1, p.164-167, 2007.

ESTATÍSTICA DE FLUÍDOS. Tensão superficial, espalhamento de líquidos, ângulo de contato e equação de laplace. Disponível em: <<http://www.aulas.e>

FERNANDES, F. F. et al. The "in vitro" antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo*, v. 49, n. 2, p. 93-95, abr. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003646652007000200005Ing=pt&nrm=iso>. Acessos em 07 maio 2018.

FILHO, S. P. C.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. n. 2, p. 09-20, 2007.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; OKAMOTO, K.; IZUMI, R.; TAGO, K.; YANAGISAWA, K.; NARUKAWA, Y.; KIUCHI, F.; KASAHARA, T.; TAMURA, H. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition 2 of the IL-33 signaling pathway. *International Immunopharmacology*. v. 25, p.189-198, 2015.

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, JR.; PETERSON, P. K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol*. v. 102, p. 158-163, 2005.

GREGORY, S. R.; PICCOLO, N.; PICCOLO, M. T.; PICCOLO, M. S.; HEGGERS, J. P. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Alter Complement Med*. V. 8, p. 77-83, 2002.

GUPTA, K. C.; KUMAR, M. N. V. R. *Biomaterials* v. 21, p. 1115, 2000.

HARNORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

- HU, F.; HEPBURN, H.R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol* N. 100, p. 276-283, 2005.
- KOSALEC, I., PEPELJNJAK, S.; BAKMAZ, M.; VLADIMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. *Acta Pharm.* v. 55, p. 423-430, 2005.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química nova*, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
- LI B. Q. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 276, n. 2, p. 534–8, 2000.
- LONGHINI, Renata et al. Obtenção de extratos de propolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev. bras. farmacogn.* João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 388-395, set. 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2007000300015&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 07 maio 2018.
- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* N. 74, p. 105-112, 2001.
- MENEZES, H. Propolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, v. 72, n. 3, p. 405-411, São Paulo, jul./set., 2005.
- MI, F. L.; SHYU, S. S.; WU, Y. B.; LEE, S. T.; SHYONG, J. Y.; Huang, R. N. Fabrication dressing. *Biomaterials.* v. 22, p. 165-173, 2001.
- MIHAI, C. M.; MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; CHIRILA, F.; MORITZ, R. F.; SCHLÜNS, H. Interactions among flavonoids of propolis affect antibacterial activity against the honeybee pathogen *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology.* v. 110, p. 68–72, 2012.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan per or: from dietary supplement to drug carrier, Atec: Grottammare, 2000.
- OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMIA, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers.* v. 53, p. 337-342. August 2003.
- OLIVEIRA, A. C. P.; SHINOBU, C. S.; LONGHINI, R.; FRANCO, S. L.; SVIDZINSKI,

- T. I. E.; Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 101, p. 493-497, 2006.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINE, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*. N. 2, p. 997-1003, 2002.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. M. S.; AQUINO, N.; RADLER, F. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. vol. 25, N.2, p. 321-326. 2002.
- RINAUDO M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* v. 31, p. 603–632, 2006.
- ROLLINI, M.; MASCHERONI, E.; CAPRETTI, G.; COMA, V.; MUSATTI, A.; PIERGIOVANNIA, L. Propolis and chitosan as antimicrobial and polyphenols retainer for the development of paper based active packaging materials. *Food Packaging and Shelf Life*. França. N. 14, p. 75-82, 2017.
- SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim. Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- SILVA, J.F.M.; SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem.* N. 99, p. 431-435, 2006.
- THARANATHAN, R.N.; PRASHANTH, K.V. H. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potentialdan overview. *Trends in Food Science & Technology*. v. 18, p. 117-131, 2007.
- TORLAK, E.; SERT, D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*. N. 60, p. 52-55, 2013.
- TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M .C.; MIORIN P. L.; PASIN F. R.; TSVETKOVA I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. N. 3(2), p. 249-254, 2006.
- UZEL, A.; SORKUN, K.; ÖNÇAG, Ö.; ÇOGULO, D.; GENÇAY, Ö.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian própolis samples. *Microbiol Res* N. 160, p. 189-195, 2005.
- VERONESE R. Própolis na clínica e cirurgia odontológica. Revisão disponível em: http://www.brazilianapis.com/public/propolis_na_clinica_e_cirurgia_odontologica.pdf Acesso em janeiro de 2010.

- WANG K.; ZHANG, J.; PING, S.; MAB, Q.; CHEN, X; XUAN, H.; SHI, J.; ZHANG, C.; HUA, F. Antiinflammatory effects of etanol extracts of Chinese propolis and budsfrompoplar (*Populus_canadensis*). *Journal of Ethnopharmacology*. v. 155, p. 300-311, August 2014.
- ZAGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, v. 2, p. 204-226, 2015.
- LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue enineering: Current state and perspectives. *Appl Microbiol Biolechnol*. v. 65, p. 1-8, 2004.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova* v. 25, p. 321-326, 2002.
- MAZZEO, C. E. D. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do btex, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, abr, 2009.
- PONSONNET, L.; COMTE, V.; OTHMANE, A.; LAGNEAU, C.; LISSAC, M.; JAFFREZIC, N. *Materials Science and Engineering*. v. 21, p. 157, 2002.
- SHIRTCLIFFE, N. J.; MCHALE, G.; ATHERTON, S.; NEWTON, M. I. An introduction to superhydrophobicity. *Advances in Colloid and Interface Science*. v. 161, p. 124–138, 2010.