



rede nordeste de biotecnologia  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI

REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA A BASE DE COLAGENO E PÓLEN  
APÍCOLA PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Afra Maria do Carmo Bandeira do Nascimento

Teresina – PI

2019

AFRA MARIA DO CARMO BANDEIRA DO NASCIMENTO

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA A BASE DE COLAGENO E PÓLEN  
APÍCOLA PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Junior

Teresina – PI

2019



FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco  
Serviço de Processamento Técnico

N244d Nascimento, Afra Maria do Carmo Bandeira do.  
Desenvolvimento de membrana a base de colágeno e pólen apícola para aplicação biotecnológica / Afra Maria do Carmo Bandeira do Nascimento. – 2019.  
104 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.  
“Orientador: Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Junior”.

1. Biomaterial. 2. Produto Apícola. 3. Fitoquímica.  
4. Genotoxicidade . 5. Cicatrização. I. Título.

CDD 660.6

**FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE**

**ALUNA:** Afra Maria do Carmo Bandeira do Nascimento

**TÍTULO DO PROJETO:** “DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA A BASE DE COLAGENO E PÓLEN APÍCOLA PARA APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA.”

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Júnior

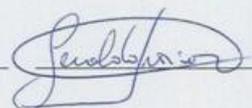
**BANCA EXAMINADORA:**

**CONCEITO**

**ASSINATURA**

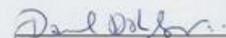
Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Júnior - UESPI  
(Presidente)

Aprovado



Prof. Dr. Daniel Dias Rufino Arcaño - UFPI  
(Examinador)

APROVADA



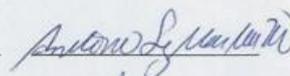
Prof. Dr. Lívio César Cunha Nunes - UFPI  
(Examinador)

APROVADA



Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho - UESPI  
(Examinador)

APROVADA



Prof. Dr. José Luiz Silva Sá – UESPI  
(Examinador)

Aprovada



**DATA DA AVALIAÇÃO:** 02 de abril de 2019.

**HORÁRIO:** 08h30

**LOCAL:** No Auditório do Geratec - UESPI

DEDICO este grau aos meus pais, Anísio e Raimunda, que tanto fizeram por mim, para que jamais me contentasse com o mínimo; à minha irmã, Simone, um exemplo; a toda a família, que contribuiu com a ascensão da minha carreira acadêmica; e a meu marido, Romério, que jamais limitou meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me encheu de coragem, determinação e disposição, para que mesmo nos momentos mais difíceis me mantivesse firme neste projeto;

Ao Prof. Dr. Geraldo Eduardo da Luz Junior pelas orientações ao longo de todo esse processo e pelo olhar analítico, crítico e otimista;

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí *campus* Angical, pela liberação das minhas atividades docentes, compreendendo a extrema necessidade de dedicação integral para o desenvolvimento do projeto;

Ao Núcleo Interinstitucional de Estudo e Geração de Novas Tecnologias – Projeto **Geratec** – UESPI, pelo apoio técnico, aqui representado pela professora Dra. Francisca Lúcia de Lima (LABMICRO) e professor Dr. José Luiz Silva Sá (QUÍMICA), bem como aos alunos e estagiários.

Ao Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – CCS/ UESPI, que viabilizaram a realização dos estudos *in vivo*, representado pelos professores Dr. Antonio Luiz Martins Maia Filho, Dr. José Figueredo-Silva e Dr. Fabricio Pires Moura Amaral e pelo técnico Dannel Cabral Leão Ferreira, bem como alunos e estagiários.

Ao laboratório do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, representado pela professora Dra. Lígia Bicudo de Almeida-Muradian e ao Dr. José Augusto Gasparotto Sattler, que viabilizaram as análises em CLAE;

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí *campus* Zona Sul, pela cessão do espaço para realização de análises, bem como à professora Dra. Mariana de Moraes Sousa, pelo acompanhamento em análises de fundamental importância do trabalho;

À professora Dra. Maria do Carmo Passos Rodrigues, da Universidade Federal do Ceará, pela colaboração em etapas importantes do desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos e familiares, que participaram cada um a seu modo para a conclusão desta etapa;

Aos companheiros de GERATEC, pela parceria e auxílio em todos os momentos da nossa jornada acadêmica.

**Meu Muito Obrigada!!!**

## RESUMO

O pólen apícola tem sido alvo de estudos que investigam sua composição química, fitoquímica e atividade antioxidante, bem como seus efeitos biológicos de ação anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana, hepatoprotetora, preventivo de prostatite benigna, antienvelhecimento e cicatrizante. Fundamentada nestas informações, o objetivo do estudo foi desenvolver membrana de colágeno contendo extrato de pólen apícola no tratamento de lesões cutâneas, avaliando seu efeito cicatrizante. A caracterização de bioativos do extrato de pólen baseou-se em testes colorimétricos para determinação do conteúdo de polifenóis totais, de flavonoides totais e da atividade antioxidante avaliada por três testes *in vitro*: DPPH, ABTS e FRAP, com identificação dos compostos via CLAE-DAD/EM-ESI. O extrato também foi testado para atividade antimicrobiana. Os materiais desenvolvidos (membrana com extrato e membrana sem extrato) foram submetidos à avaliação genotóxica via cometa alcalino e micronúcleo. As membranas foram implantadas via intraperitoneal nos animais e verificadas as alterações em exposição aguda e crônica. A cicatrização foi acompanhada histologicamente em três períodos 7, 14 e 21 dias, sendo quatro grupos experimentais (n=5): grupo controle, sem cobertura; grupo pomada, representando o parâmetro comercial; grupo membrana, que recebeu a membrana contendo o extrato; e grupo que recebeu a membrana sem o extrato. Pela avaliação fitoquímica, notou-se um conteúdo de polifenóis considerável quando comparados aos dados da literatura, os quais após identificação indicavam para uma boa atividade anti-inflamatória. Os extratos mostraram ação antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, para ambos os testes de genotoxicidade, as membranas não apresentaram alterações mutagênicas significativas, indicando a segurança de uso. A avaliação histológica comprovou a eficiência da membrana no processo de cicatrização, mostrando um comportamento de cicatrização superior ao tratamento comercial usado como referência, sendo observado que aos 21 dias a área da lesão encontrava-se restaurada e sem sinais inflamatórios.

**Palavras-chave:** Biomaterial; produto apícola; fitoquímica; genotoxicidade; cicatrização

## ABSTRACT

Bee pollen has been the subject of studies investigating its chemical composition, phytochemical and antioxidant activity, as well as its biological effects of anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial, hepatoprotective, benign prostatic, antiaging and healing. Based on this information, the objective of the study was to develop and apply a membrane of collagen containing bee pollen extract in the treatment of cutaneous lesions, evaluating its healing effect. The bioactive characterization of the pollen extract was based on colorimetric tests to determine the total polyphenols, total flavonoids and antioxidant activity evaluated by three in vitro tests: DPPH, ABTS and FRAP, with identification of compounds via HPLC-DAD / ES-MS. Well-conducted antimicrobial activity tests. The materials developed (membrane with extract and membrane without extract) were submitted to the evaluation of genotoxicity, tested by alkaline comet and micronucleus (MN). The membranes were implanted intraperitoneally in the animals and the changes in acute and chronic exposure were verified. The healing test was followed histologically for 21 days, with three groups (n = 5): GC control group, ie, no cover - exposed wound; GP ointment group, which was the commercial parameter; and GM membrane group, which received the membrane containing the extract. By the phytochemical evaluation a very considerable polyphenylene content was observed when compared to other results present in the literature. Its after identification indicated for a good anti-inflammatory activity. The extracts showed antimicrobial action against *Pseudomonas aeruginosa*. For both genotoxicity tests, the membranes showed no significant mutagenic changes. Histological evaluation proved the efficiency of the membrane in the healing process, because at 21 days the area of the lesion was restored and without inflammatory signs.

**Keywords:** Biomaterial; bee product; phytochemical; genotoxicity; healing

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Fases do processo de cicatrização da pele .....	14
<b>Figura 02:</b> Demonstração dos estratos da pele: composição geral e morfologia .....	18
<b>Figura 03:</b> Esquema representativo do procedimento experimental para realização da análise de atividade antimicrobiana por CIM .....	39
<b>Figura 04:</b> Esquema representativo do procedimento experimental para confecção das membranas .....	40
<b>Figura 05:</b> Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio cometa alcalino .....	41
<b>Figura 06:</b> Microfotografia das lâminas produzidas a partir do sedimento polínico acetolisado em microscópio óptico em lente de aumento de 100x .....	44
<b>Figura 07:</b> Avaliação do dano/reparo pelo comprimento da cauda de DNA formada .....	58
<b>Figura 08:</b> Avaliação do dano/reparo pelo percentual de DNA na cauda do cometa .....	59
<b>Figura 09:</b> Aspecto macroscópico da contração da ferida dos camundongos .....	62
<b>Figura 10:</b> Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE, 7 dias após a lesão (400x) .....	63
<b>Figura 11:</b> Fotomicrografias das secções histológicas coradas em picrossírius, 7 dias após a lesão (400x) .....	64
<b>Figura 12:</b> Índice de maturação do colágeno 7 dias após a lesão.....	65
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE, 14 dias após a lesão (400x) .....	66
<b>Figura 14:</b> Fotomicrografias das secções histológicas coradas em picrossírius, 14 dias após a lesão (400x) .....	67
<b>Figura 15:</b> Índice de maturação do colágeno 14 dias após a lesão .....	68
<b>Figura 16:</b> Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE, 21 dias após a lesão (400x) .....	69
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografias das secções histológicas coradas em picrossírius, 21 dias após a lesão (400x) .....	70
<b>Figura 18:</b> Índice de maturação do colágeno 21 dias após a lesão .....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Tipos de colágenos e respectivos tecidos cuja composição majoritária do tecido conectivo seja correspondente .....	26
<b>Tabela 02:</b> Membranas de colágeno comercialmente disponíveis .....	27
<b>Tabela 03:</b> Espectro polínico das amostras de pólen apícola .....	45
<b>Tabela 04:</b> Conteúdo de polifenóis, flavonoides e de atividade antioxidante do extrato de hidroetanólico de pólen apícola .....	48
<b>Tabela 05:</b> Compostos fenólicos identificados no extrato etanólico de pólen apícola da região norte do Piauí por CLAE-DAD/EM-ESI (tempo de retenção/ $m/z$ ) .....	51
<b>Tabela 06:</b> Atividade antimicrobiana dos extratos de pólen apícola contra as espécies testadas por Concentração Mínima Inibitória – CIM .....	57
<b>Tabela 07:</b> Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de <i>Rattus norvegicus</i> expostos à membrana de pólen apícola .....	60

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.Objetivo Geral .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.Objetivos Específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Anatomia da Pele e Etiologia da Ferida .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.Processo de Reparo Cutâneo.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.Biomateriais e Substitutos Dérmicos .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.1. Colágeno .....</b>	<b>25</b>
<b>3.4.Pólen Apícola .....</b>	<b>30</b>
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Pólen apícola.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.1. Análise polínica.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.2. Preparação e caracterização dos extratos etanólicos do pólen apícola ..</b>	<b>35</b>
<b>4.1.2.1.Análise de fenólicos totais .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2.2.Determinação de flavonoides .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1.2.3.Determinação da atividade antioxidante via DPPH .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2.4. Atividade antioxidante via ABTS .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2.5.Atividade redutora FRAP .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.2.6. Identificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD/EM-ESI .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.2.7.Atividade antimicrobiana .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2. Obtenção da membrana .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3. Estudos <i>in vivo</i> da membrana .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.1. Ensaio cometa alcalino .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3.2. Teste do micronúcleo .....</b>	<b>41</b>
<b>4.3.3. Ensaio biológico de cicatrização .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3.3.1.Procedimentos histológicos .....</b>	<b>42</b>

4.4. Análise Estatística .....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1. Pólen Apícola .....	44
5.1.1. Análise polínica .....	44
5.1.2. Identificação dos compostos bioativos do pólen apícola.....	47
5.1.3. Atividade antimicrobiana .....	56
5.2. Estudos <i>in vivo</i> .....	57
5.2.1. Teste cometa alcalino .....	58
5.2.2. Teste de micronúcleo .....	59
5.2.3. Ensaio biológico de cicatrização .....	61
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>98</b>

## 1. INTRODUÇÃO

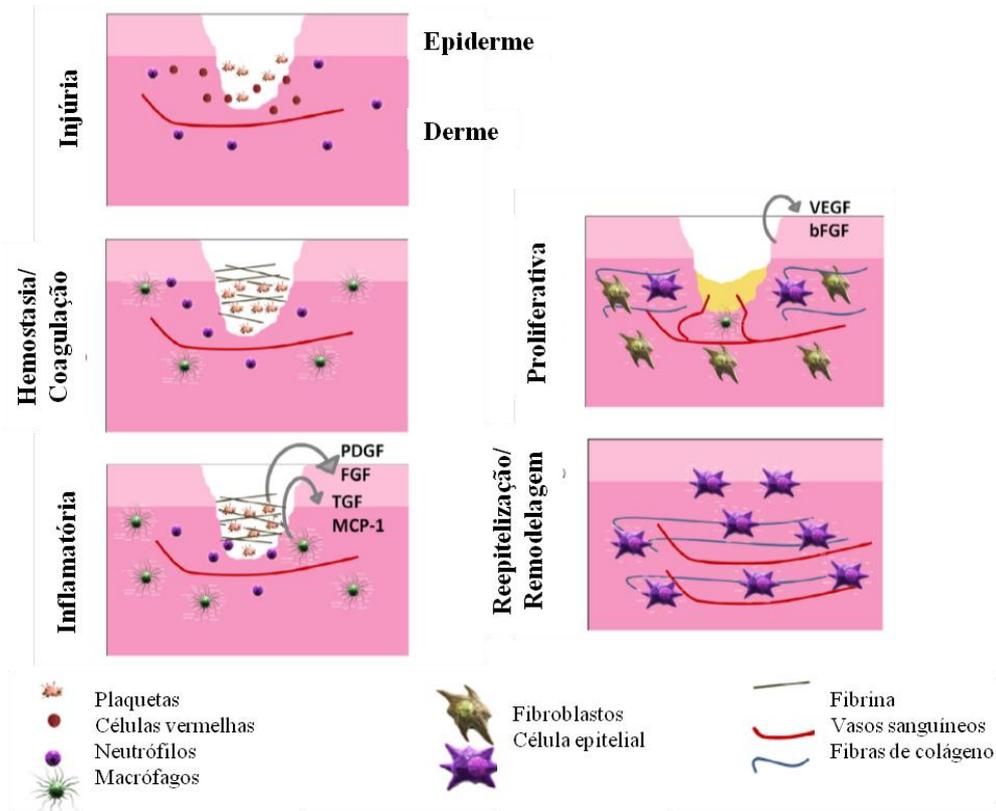
A pele é o maior órgão do corpo humano e um dos mais complexos, estando mais susceptível a ser afetado por lesões, pois atua como barreira de proteção contra patógenos, danos internos e externos ao corpo e contra a desidratação excessiva. Ferimentos que resultam em danos extensos à pele exigem cobertura imediata para ajudar no processo de cura (KOLLER, BAKOS, SADLONOVA, 2001; JIN et al., 2013).

A ferida pode ser definida como uma perda, ou ruptura, da continuidade celular e anatômica ou funcional do tecido vivo. Nesta denominação também podem ser incluídas mordidas, queimaduras, abrasão da ferida cirúrgica, laceração ou fase inflamatória aguda. A cicatrização/reparo de feridas é um processo natural do organismo para regeneração do tecido dérmico e epidérmico, no qual ocorre síntese de colágeno e macromoléculas extracelulares que são, posteriormente, remodeladas para formar cicatriz. No entanto, feridas e lesões de distúrbios fisiológicos merecem cuidados adequados. E para quaisquer casos são necessários apoios médicos capazes de acelerar o processo cicatricial, bem como proteger lesões contra infecções oportunistas (KOKANE et al., 2009; VASHISTH et al., 2016 RAMOS et al., 2016).

O reparo tecidual, algumas vezes também chamado de cura, refere-se à restauração da arquitetura e da função dos tecidos após uma lesão. Por convenção, o termo reparo é frequentemente empregado para tecidos parenquimatosos e conjuntivos, enquanto o termo cura é utilizado para os epitélios superficiais. A cura de feridas cutâneas envolve tanto a regeneração epitelial como a formação de tecido conjuntivo cicatricial e, assim, ilustra os princípios gerais que se aplicam ao reparo de todos os tecidos (ROBBINS, COTRAN, 2016).

Resumindo as ocorrências das fases de cura epitelial (Figura 01), tem-se que: na fase inflamatória, a prostaglandina favorece a exsudação vascular, estimula a mitose celular e a quimiotaxia de leucócitos. Na etapa de proliferação ocorre a neo-angiogênese, onde são formados novos vasos sanguíneos na região danificada, responsáveis pela produção de fibroblastos que sintetizarão o colágeno e os macrófagos para o centro da ferida, sendo que a matriz extracelular age na restauração da continuidade do tecido lesado, servindo como um suporte para a migração celular. E na fase de maturação ocorre um aumento da resistência da ferida, sem aumento na quantidade de colágeno, pois há um equilíbrio de produção e destruição das fibras de colágeno, por ação da collagenase (MORAES, 2013; LOZADA, CORREA, 2017).

**Figura 01:** Fases do processo de cicatrização da pele



Fonte: MOURA et al., 2013 (Adaptada).

O tratamento de feridas representa alto impacto socioeconômico no segmento de cuidados com a saúde para pacientes, famílias e instituições públicas de saúde nos países em desenvolvimento e desenvolvidos (AGYARE et al., 2016). Logo, para acelerar o processo de cicatrização, considera-se como padrão-ouro para feridas crônicas o auto-enxerto de espessura parcial. No entanto, há limitações nesse modelo, como: morbidade e dor severa no local doador. Outros métodos são de uso regular, tais como curativo de pele e fator de crescimento, porém necessitam de melhoria; e dentre as estratégias ascendentes, tem-se: fornecimento de siRNA e o direcionamento de moléculas de mRNA e receptores no microambiente da ferida; uso de células-tronco isoladas de diferentes tecidos e a gelatina de Wharton; e uso de sensores, uma alternativa para diminuir os custos e melhorar os cuidados (DREIFKE, JAYASURIYA, JAYASURIYA, 2015).

Outra estratégia comum para a engenharia de tecidos, e mais acessível, é o uso de *scaffolds* poliméricos tridimensionais. Estudos com polímeros naturais ou sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis levaram a um desenvolvimento substancial de novos tipos de curativos e a aplicações notáveis na área biomédica, especialmente para medicina regenerativa. Nesse sentido, os materiais mais promissores para o curativo de feridas e

queimaduras ainda são a base de polímeros naturais, como polissacarídeos (alginatos, quitina, quitosana, heparina, condroitina), proteoglicanos e proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, queratina, fibroína de seda, casca de ovo membrana) (MOGOSANU, GRUMEZESCU, 2014).

O emprego de polímeros no tratamento de feridas tem sido amplamente estudado com base nas muitas vantagens do uso desses agentes macromoleculares, como a biocompatibilidade e suas propriedades não irritantes e não tóxicas (DANTAS et al., 2011). O colágeno é um biomaterial importante em aplicações médicas devido às suas características especiais, como a biodegradabilidade e a baixa antigenicidade. Assim, o colágeno, como um biomaterial, tem sido usado em sistemas de administração de medicamentos e engenharia de tecidos. As membranas à base de colágeno também são utilizadas na terapia periodontal e de implantes como barreiras para prevenir a migração epitelial e permitem células com capacidade regenerativa para repovoar a área de defeitos (KHAN, KHAN, BEY, 2011).

Na maioria dos casos, a complicação na cicatrização é devida à inflamação. Esta resulta em uma geração contínua de espécies reativas, como o radical superóxido ou o peróxido de hidrogênio não radical. Um desequilíbrio entre as espécies de oxigênio e os mecanismos de defesa antioxidante de uma célula, leva a uma produção excessiva de metabólitos de oxigênio, promovendo a condição de "estresse oxidativo". O estresse oxidativo resulta em peroxidação lipídica, quebras de DNA e inativação enzimática, incluindo enzimas eliminadoras de radicais livres. A evidência do papel dos oxidantes na patogênese de muitas doenças sugere que os antioxidantes podem ser de uso terapêutico nessas condições (GOMATHI et al., 2003).

O meio científico dispõe de dados sobre plantas medicinais que afetam várias fases do processo de cicatrização de feridas, como coagulação, inflamação, fibroplasia, epitelização, colagênese e contração da ferida. De posse dessas informações, profissionais da medicina alternativa fazem uso dos extratos de plantas medicinais para tratar seus pacientes (JIN et al., 2013). Essa prática é comum em países em desenvolvimento, onde o uso de remédios herbais para o tratamento eficaz das feridas contribui para minimizar as despesas do tratamento médico. Vários parâmetros *in vitro* e *in vivo* são utilizados para avaliar a atividade funcional de plantas medicinais usando extratos, frações e compostos isolados. (AGYARE et al., 2016).

Os produtos apícolas são bem conhecidos na medicina tradicional e seus usos se expandiram da área de alimentos saudáveis para a médica. O pólen é um pó fino produzido pelas flores das plantas, especificamente são as células reprodutoras masculinas de flores, e

recolhido por abelhas (MOHDALY et al., 2015), que tem se destacado em função da presença de compostos bioativos associados a benefícios para a saúde.

O pólen é um dos produtos apícolas comumente usados pela medicina popular, e embora seus efeitos farmacológicos ainda não estejam todos cientificamente comprovados, sabe-se que ele representa uma fonte considerável de compostos com potencial de proteção da saúde, como fitoesteróis e é rico em fitoquímicos, como compostos fenólicos. Entretanto, a composição do pólen ainda não está padronizada e nem definida na farmacopeia, pois podem variar devido à sua origem botânica e geográfica, as espécies vegetais, as condições ambientais, a idade e o estado das plantas (ALICIC et al., 2014; SATTLER et al., 2015). Os principais constituintes ativos do pólen apícola incluem isoflavonas, flavonóis e lignanas, importantes na modulação hormonal de mulheres e homens; e compostos fenólicos, que possuem altos níveis de atividade antioxidante e sequestradora de radicais, e associados a esses polifenóis há muitas funções farmacológicas como antimicrobiano, anti-inflamatório, hepatoprotetor, antiaterosclerótico e antitumoral (MOHAMED et al., 2018).

Olczyk et al. (2016) verificaram a ação cicatrizante do pólen apícola através de uma pomada, que demonstrou reepitelização e fechamento da ferida de queimadura, com efetiva atividade antimicrobiana. Tomando por base estes achados e tendo consciência da abertura que o ramo de materiais para recuperação cutânea possui, desenvolveu-se uma biomembrana para implantar sobre lesões de pele, aproveitando o conteúdo de substâncias bioativas presentes no pólen apícola e que podem ser importantes na aceleração desse processo de cura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver membrana de colágeno contendo extrato de pólen apícola e avaliar sua atividade cicatrizante no tratamento de lesões cutâneas.

### **2.2 Objetivos específicos**

Identificar a origem botânica do pólen apícola adquirido na região norte do estado do Piauí;

Estabelecer o perfil de compostos bioativos presentes no pólen apícola;

Identificar e quantificar os polifenóis e flavonoides presentes no pólen apícola por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas;

Avaliar a atividade antimicrobiana por concentração inibitória mínima do extrato de pólen apícola;

Analisar por teste cometa e de micronúcleo o potencial genotóxico e mutagênico do biomaterial desenvolvido;

Analisar através de estudo histológico e de deposição colagênica o efeito cicatrizante do material desenvolvido.

.

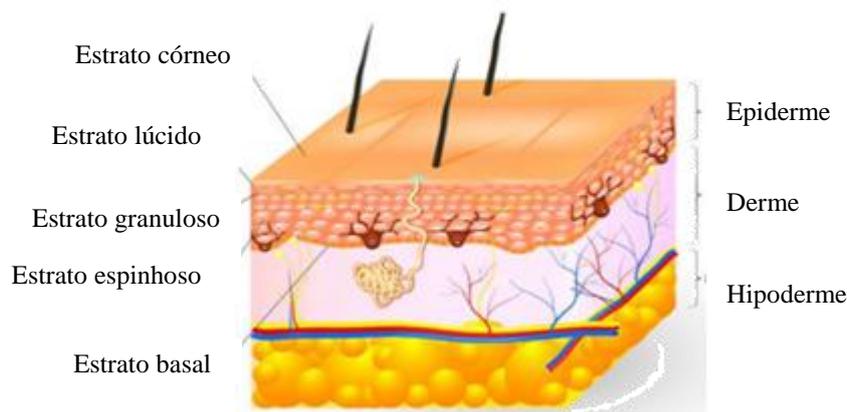
### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Anatomia da Pele e Etiologia da Ferida

A pele desempenha diversas funções no organismo humano, tais como: ser o principal obstáculo contra a ação de agentes externos, como microrganismos; impedir a perda excessiva de líquidos; manter a temperatura corpórea; sintetizar vitamina D a partir da exposição aos raios solares; agir como órgão sensorial; e participar da termorregulação (BAJAY, JORGE, DANTAS, 2003). Além disso, ela previne a perda substancial de fluidos corporais e tem papel importante na defesa imunológica. Sua estrutura apresenta três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme, as quais contam com queratinócitos, melanócitos, fibroblastos e células endoteliais para desempenharem suas funções, conferindo uma pele ativa (BOTTCHEHABERZETH, BIEDERMANN, REICHMANN, 2010; CASTAÑEDA, 2017).

A camada mais externa é a epiderme, a qual se constitui em tecido estratificado queratinizado com variações estruturais e funcionais, cuja principal função é produzir queratina. Ela é composta por quatro camadas distinguíveis: estrato córneo, granuloso, espinhoso e estrato basal (Figura 02). Neste último, há células epiteliais que se proliferam continuamente para que seja mantido o seu número (MENDONÇA, RODRIGUES, 2011). Por ser a camada mais externa, é a que está mais sujeita a sofrer lesões.

**Figura 02:** Demonstração dos estratos da pele: composição geral e morfologia



Fonte: POOL, 2018 (adaptada)

Assim, quando este órgão sofre uma injúria, seja ela de natureza física, química, mecânica ou por afecção clínica, isto pode gerar a abertura de uma ferida, a qual representa a descontinuidade do tecido corpóreo em maior ou em menor extensão, conduzindo o organismo à reação, no sentido de recompor o tecido lesado (UNIMED, 2016).

Essa perda tecidual pode afetar a derme incompleta ou completamente e baseado nisto, a ferida pode ser definida como de espessura parcial ou total, respectivamente. No primeiro caso, a causa pode ser por procedimentos dermatológicos ou por traumatismos e no reparo ocorre reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não injuriada, gerando uma cicatriz praticamente imperceptível. Já no segundo caso, forma-se tecido de granulação e a epitelização acontece apenas nas margens da ferida, resultando em uma cicatriz perceptível e, muitas vezes, pronunciada (MANDELBAUM, SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

As feridas podem ser classificadas quanto: (I) à causa em: cirúrgicas de incisão, de excisão ou por punção, traumáticas mecânicas, químicas ou físicas, e ulcerativas; (II) ao conteúdo microbiano: limpas, limpas contaminadas, contaminadas ou infectadas; (III) ao tipo de cicatrização: por primeira, segunda ou terceira intenção; (IV) ao grau de abertura: abertas ou fechadas; e (V) à duração: agudas ou crônicas (SANTOS et al., 2011).

A cicatrização envolve como eventos centrais o fechamento oportuno da ferida, alívio imediato da dor e uma cicatriz esteticamente aceitável. Com as pesquisas sobre cicatrização de feridas é possível compreender melhor os processos implicados no reparo e regeneração de tecidos (DREIFKE, JAYASURIYA, JAYASURIYA, 2015).

### **3.2 Processo de Reparo Cutâneo**

O reparo da ferida é o esforço dos tecidos para restaurar a função e estruturas normais da pele. Essa recuperação pode ser diferenciada em dois processos: regeneração e reparação. A primeira consiste na restauração perfeita da estrutura do tecido pré-existente e não há formação de cicatriz, entretanto ela só é observada no desenvolvimento embrionário, em organismos inferiores e em órgãos como ossos e fígado. Enquanto o reparo envolve quatro fases básicas: hemostasia, inflamação, proliferação e maturação, gerando cicatrizes em maior ou menor extensão (TAZIMA, VICENTE, MORIYA, 2008; CARDOSO et al., 2013; BORTOLI, PRATO, KROTH, 2016).

A seguir são descritos, resumidamente, os eventos que ocorrem em cada fase de acordo com Chin, Diegelmann e Schultz (2005):

(a) Hemostasia: ocorre imediatamente após a lesão para prevenir sangramento. Há vasoconstrição e ativação das plaquetas, as quais aderem e se agregam no local da lesão. As plaquetas também liberam fatores de crescimento, AMP cíclico e glicoproteínas adesivas, cujas principais são: o fibrinogênio, a fibronectina, a trombospondina e o fator de von

Willebrand. Com a sucessão da agregação plaquetária, forma-se um coágulo de fibrina que funciona como uma matriz provisória. De acordo com Kumar, Abas e Aster (2016), a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumenta a permeabilidade vascular e o edema. À proporção que ocorre desidratação na superfície externa, forma-se uma crosta que recobre a ferida.

(b) Inflamação: ocorre nas primeiras 24 horas após a lesão e pode durar até duas semanas no processo de cura por primeira intenção e significativamente mais em feridas crônicas. Os mastócitos são responsáveis pelos primeiros sinais da inflamação: *rubor* (vermelhidão), *ardor* (calor), *tumor* (inchaço) e *dolor* (dor) ao redor do local da ferida. Neutrófilos, monócitos e macrófagos são as células-chave durante esta fase, porque removem bactérias e detritos da ferida e liberam mediadores solúveis. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias que respondem aos mediadores solúveis liberados pelas plaquetas e pela cascata de coagulação, sendo substituídos no terceiro dia por macrófagos e o tecido de granulação (proliferação de fibroblastos e capilares de paredes finas em meio a uma matriz extracelular - MEC - frouxa contendo células inflamatórias) ocupa o espaço da ferida. Os macrófagos teciduais diferem dos neutrófilos em sua capacidade de regular mais estritamente a destruição proteolítica do tecido da ferida secretando inibidores das proteases; e favorecerem a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização, pois liberam fatores de crescimento e citocinas, dentre os quais estão os que ativam fibroblastos para a nova matriz tecidual, enquanto outros promovem a angiogênese. A ausência de neutrófilos e uma diminuição no número de macrófagos na ferida é uma indicação do início da fase proliferativa.

(c) Proliferação: as células epiteliais das bordas da ferida mostram atividade mitótica intensa e dentro de 24 a 48 horas iniciam a migração e a proliferação ao longo da derme. Nesta fase ocorre também a substituição da matriz provisória de fibrina por uma nova matriz de fibras de colágeno, proteoglicanos e fibronectina para restabelecer a estrutura e a função do tecido, bem como a angiogênese e a formação do tecido de granulação. Por volta do quinto dia, a neovascularização atinge seu pico, mantendo o tecido de granulação recém-formado edemaciado. Os fibroblastos, fundamentais nesta fase, migram para a ferida em resposta a múltiplos mediadores solúveis, aparecendo em número aumentado e bastante ativos no tecido de granulação, onde modificam sua morfologia e começam a proliferar e sintetizar os componentes do tecido de granulação, incluindo colágeno, elastina e proteoglicanos. A epitelização é a marca clínica da cicatrização.

(d) Remodelamento/maturação: o tecido de granulação amadurece e aumenta a resistência à tração da cicatriz e do tecido. A maturação do tecido de granulação envolve redução no número de capilares por meio da agregação em vasos maiores e uma diminuição na quantidade de glicosaminoglicanos e da água associada a eles, e proteoglicanos. A densidade celular e atividade metabólica no tecido de granulação diminuem durante a maturação. Alterações também ocorrem no tipo, quantidade e organização do colágeno, com aumento da resistência à tração e substituição do colágeno tipo III pelo tipo I, o colágeno fibrilar dominante na pele.

O resultado do processo de reparo é influenciado pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação das proteínas da MEC. A degradação dos colágenos e de outros componentes da MEC é realizada por uma família de metaloproteinases de matriz (MMPs), que abrangem colagenases, que clivam o colágeno fibrilar; gelatinases, que degradam o colágeno amorfo e a fibronectina; e estromelisinases, que degradam proteoglicanos, laminina, fibronectina e colágeno amorfo. As MMPs são produzidas na forma inativa por fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, sinoviócitos e por células epiteliais ativadas por proteases presentes na área lesada. Ao fim do primeiro mês, a cicatriz compreende um tecido conjuntivo em grande parte desprovido de células inflamatórias, recoberto por uma epiderme essencialmente normal, porém sem anexos cutâneos, uma vez que desaparecem de forma permanente (KUMAR, ABAS, ASTER, 2005).

Percebe-se então que todos esses fatos são regulados, em cada etapa, por uma série de mediadores estando envolvidos os derivados da circulação, tais como fatores de coagulação, moléculas do sistema fibrinolítico e hormônios (esteroidais, tireodianos e insulina); cininas, como histamina, bradicinina e serotonina; mediadores peptídicos, como citocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos e estruturas de matriz extracelular; e mediadores lipídicos, os eicosanoides e PAF. A variação na concentração dos mediadores ao longo das fases demonstra a existência de interdependência destes para um mesmo evento (BALBINO, PEREIRA, CURI, 2005).

A cicatrização das feridas pode ocorrer por primeira intenção, quando a perda tecidual não impede que as bordas da lesão sejam aproximadas ou por segunda intenção, quando a perda tecidual impossibilita a junção das bordas lesadas, formando tecido de granulação; ou por terceira intenção, quando a ferida é mantida aberta para uma cicatrização por segunda intenção até substituição do tecido perdido através de enxertos (TAZIMA, VICENTE, MORIYA, 2008).

Uma das estratégias empregadas para auxiliar no processo de cicatrização por segunda intenção é o transplante de pele autóloga de um sítio de doador saudável, seja como uma espessura total ou como enxerto de pele de espessura parcial, que representa o padrão-ouro atual para tratamento de feridas severas. Entretanto, as áreas doadoras são limitadas por danos prolongados e a produção de uma área suficiente de enxertos, com preparação de folhas de células epidérmicas confluentes multicamadas em cultura, é um procedimento demorado. Além disso, há muitas dificuldades para o manejo desses enxertos devido à sua natureza frágil (REZAPOUR-LACTOEE, et al., 2016).

Desta forma, o uso de substitutos dérmicos permite a manipulação de feridas complexas e queimaduras, com exposição óssea e de tendão, de forma adequada. Em geral, a escolha do material deve ser feita de acordo com os resultados e funções esperados (URBINA, RIDER, 2016) e considerar os fatores de eficácia, segurança e custo, para que o paciente possa mantê-lo e conseguir um resultado satisfatório, pois, em geral, as lesões têm evolução longa e cicatrização demorada (FRADE et al., 2011).

Os curativos ideais são os que promovem a cicatrização de feridas, mantendo um meio úmido enquanto absorvem o excesso de exsudato, fornecem proteção mecânica, ajudam no desbridamento, permitem a troca gasosa, mas são impermeáveis aos microrganismos, fáceis de usar e econômicos (DRYDEN, SHOEMAKER, KIM, 2012). Logo, a escolha da cobertura da ferida deve ser assertiva, pois além de ajudar no processo de cicatrização, minimiza a dor, confere conforto ao paciente e recupera o tecido lesado. Dentre os mais utilizados tem-se: hidrogel à base de carboximetilcelulose; alginato de cálcio; filme de poliuretano; papaína, gaze não aderente impregnada de petrolato ou de parafina; curativo absorvente com prata, dentre outros (SANTOS et al., 2011).

### **3.3 Biomateriais e Substitutos Dérmicos**

O advento dos substitutos dérmicos representa uma ferramenta inovadora para o reparo e reconstrução de defeitos cutâneos profundos (WANG et al., 2016). Dada a variedade de filmes curativos, a indústria farmacêutica os classifica conforme seu modo de ação em: passivos – apenas cobrem a ferida e não auxiliam na cicatrização; interativos – contribuem para a cicatrização impedindo a passagem de bactérias e permitindo a passagem apenas de oxigênio e vapor de água; e ativos – fornecem agentes antimicrobianos ou fármacos que contribuem para o processo de cicatrização dos ferimentos. (PAUL; SHARMA, 2004; VASCONCELOS et al., 2011; ROMANO et al., 2015).

Um dos grandes desafios da pesquisa na área de regeneração de pele consiste no desenvolvimento de biomateriais a partir de matérias-primas de baixo custo, fácil acesso e com características adequadas para a função destinada (DALLAN, 2005). O sucesso dos biomateriais na recuperação de tecidos depende das características física e química do material, da capacidade de ser degradado, da absorção celular, da ligação celular e força mecânica (HIRATA et al., 2015). Chaudhari et al. (2016) destacam que o campo da engenharia de tecido mostrou grande evolução com amplo desenvolvimento de materiais para este segmento, e por isso é necessário o conhecimento das propriedades, vantagens e desvantagens de cada biomaterial e *scaffolds* para acelerar a produção de suportes adequados para aplicações de regeneração de tecidos de pele.

Como características adequadas dos biomateriais podem-se destacar as propriedades biológicas: biocompatibilidade, hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade, estimulação de adesão e proliferação celular; as propriedades físicas: morfologia da superfície, energia superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, cor, transparência e permeabilidade; as propriedades mecânicas: tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade; e as propriedades químicas: densidade, estabilidade, resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo (SAMPAIO, CARVALHO, CARNEIRO, 2018). Dentre essas características é dado destaque para a biocompatibilidade, pois esta propriedade é a garantia de que um material não é tóxico para o sistema biológico, sendo possível obter respostas satisfatórias a partir da interação entre um implante e os tecidos vivos do organismo após a sua aplicação específica (TORRES, COMMEAUX, TRONCOSO, 2012; BARUD et al., 2016).

Além disso, a projeção é que os curativos evitem a perda de fluido corporal, bem como o acúmulo de exsudato, protejam as feridas de contaminação externa, com efeitos bactericidas suficientes para inibir a infecção, e criem um leito de ferida ideal para auto enxertar (DANTAS et al., 2011). A ascensão de curativos antimicrobianos, que se caracterizam por serem produtos que fornecem tratamentos tópicos para feridas, considera a inclusão de substâncias que possam agir como antimicrobianos. Desta forma, além de auxiliar na cicatrização dos ferimentos, os curativos ativos impedem que os microrganismos que habitam a pele humana infectem a ferida (Hess, 2012 citado por HUBNER, 2017).

Para a confecção de curativos o material mais utilizado é a gaze fibrosa devido à sua pronta disponibilidade e baixo custo. Contudo, hidrogéis também têm sido explorados, em função da textura macia, flexibilidade, adaptar-se à área da ferida, ser biocompatível e

permeável ao vapor de água e aos metabólitos. Além disso, quando utilizados para essa finalidade, eles podem absorver o exsudato liberado pelo ferimento, ao mesmo tempo em que permitem o acesso de oxigênio ao local da ferida, acelerando a cicatrização. (LU et al., 2010).

Os curativos de feridas em bicamadas híbridas também são muito promissores, uma vez que combinam as vantagens de uma subcamada natural e uma camada superior sintética. É importante notar que o complexo design de integrar duas camadas distintas em uma única estrutura requer boa aderência entre as duas camadas para garantir que a delaminação não ocorra durante o uso (SHEMESH, ZILBERMAN, 2014).

Dreike, Jayasuriya e Jayasuriya, (2015) demonstram a existência de uma variedade de curativos no mercado, dentre eles tem-se a base de quitosana, ácido hialurônico, colágeno e silício. Entretanto, outros biomateriais estão sob avaliação: alginatos, heparina, celulose e gelatina. O desenvolvimento e utilização de membranas biocompatíveis para estimular a cicatrização de feridas dérmicas e mucosas têm sido bastante recorrentes. Elas podem ser absorvíveis ou não, e fatores como sua constituição, morfologia, textura da superfície, tamanho das porosidades e duração da integridade funcional podem influenciar no êxito da sua utilização no processo cicatricial (YAMATOOGI et al., 2005).

Um biomaterial utilizado por muito tempo e que ainda se mostra significativo no reparo da pele é a membrana amniótica humana (AM). Usada pela primeira vez no transplante de pele, passou a ser empregada no tratamento de queimaduras, como curativo cirúrgico; na reconstrução cirúrgica da cavidade oral; para reconstrução da superfície ocular, bexiga, vagina, oclusão do pericárdio; e na prevenção de adesões cirúrgicas. Foi consolidada sua capacidade de reduzir a cicatrização e inflamação devido às suas propriedades antimicrobianas (MUNOYATH, SATHISHWARAN, PRASAD, 2015).

A partir de então várias opções de membrana foram desenvolvidas, Cardoso et al. (2013) desenvolveram uma membrana de poli(L-ácido) (PLLA)/Trietil-citrato que favoreceu o processo de reparação e cicatrização da ferida de forma organizada, protegendo a lesão, apresentando-se promissora como alternativa para curativos cutâneos, principalmente nos pacientes em que há lesões cutâneas agudas extensas, dificultando a obtenção de enxertos autólogos, além de ser um procedimento cirúrgico de menor complexidade.

Schanuel et al. (2015) desenvolveram filmes de PVA-SNO capazes de liberar NO espontaneamente, mas quando combinado com uma camada de hidrogel F127 essa liberação foi reduzida, aumentando a dose total de NO e o seu tempo de liberação, resultando no aperfeiçoamento da contração da ferida, diminuindo o intervalo da ferida e a densidade

celular e acelerando a fase inflamatória. Esta melhoria é caracterizada por uma elevação na diferenciação miofibroblástica e aumento da expressão do colágeno tipo III, mostrando seu potencial como uma nova abordagem para o curativo de feridas. Já Unnithan et al. (2012) desenvolveram, por técnica de *electrospun*, nanofibras de poliuretano contendo cloridrato de ciprofloxacina (CipHCl) visando o controle microbiano, cuja presença do CipHCl mostrou ação com um largo grupo de bactérias, evitando infecções.

Entretanto, dentre a variedade de polímeros usados para a produção de materiais para acelerar os processos cicatriciais um dos mais empregados é o colágeno. Assim, devido a sua biocompatibilidade e fraca interação com a matriz extracelular, as membranas contendo colágeno têm sido bastante aplicadas na reparação de traumas mucocutâneos químicos e mecânicos (YAMATOOGI et al., 2005).

### 3.3.1 Colágeno

Até a década de 1980, a importância do colágeno como biomaterial era restrita à produção de suturas cirúrgicas. Já na década de 1990, foram identificados 26 tipos de colágeno (tabela 01) devido à complexidade e diversidade de estrutura, presença adicional de domínios não-helicoidais, estrutura de montagem e função do colágeno. O grupo foi segmentado em colágeno formador de fibrilas (tipos I, II, III, V e XI), colágeno associado a fibrilas (tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX e XX) e outros tipos de colágeno (tipos IV, VI, VII, VIII e X) (CARDOSO et al., 2017). Entretanto, todos os membros são caracterizados por conter domínios com repetições do tripéptido d Gly-X-Y envolvido na formação de colágeno. As funções desta família heterogênea não se limitam a fornecer componentes estruturais do esqueleto fibrilar da matriz extracelular, mas uma grande variedade de funções é definida por domínios proteicos adicionais (GELSE, POSCHL, AIGNER, 2003).

Entre os vários tipos de colágeno, o tipo I é o mais abundante nos animais, constituindo pele, tendões, ligamentos e ossos. Essa diversidade biológica do colágeno depende da composição aminoacídica do mesmo, a qual agrega tanto aminoácidos não essenciais, como: glicina, prolina, hidroxiprolina, arginina e alanina, quanto essenciais: metionina, tirosina e histidina (WOLF, 2007).

**Tabela 01:** Tipos de colágenos e respectivos tecidos cuja composição majoritária do tecido conectivo seja correspondente

<b>Tipo de colágeno</b>	<b>Tecidos</b>
I	A maioria dos tecidos conjuntivos, isto é, ossos, pele, tendão, vasos sanguíneos.
II	Cartilagem e vítreo do olho.
III	Veias de sangue.
IV	Membranas de porão em todos os órgãos.
V	Tendões, córnea e tecidos intersticiais.
VI	Fígado, rim e pericôndrio.
VII	Junção epidérmica / dérmica.
VIII	Células endoteliais.
IX	Cartilagem.
X	Cartilagem hipertrófica e mineralizadora.
XI	Cartilagem.
XII	Tendões e colágeno associado a fibrilas.
XIII	Epiderme, folículos pilosos e células de raízes de unhas.
XIV	O mesmo que o tipo I.
XV	Fibroblastos, células musculares lisas, rim, pâncreas.
XVI	Fibroblastos, amnios, queratinócitos.
XVII	Hemidesmossomas, pele, junções dérmico-epidérmicas.
XVIII	Pulmões, fígado e rins.
XIX	Olhos, cérebro, testículos e tecidos embrionários.
XX-XXV	Epitélio da córnea, pele embrionária, cartilagem esternal, tendão, parede do vaso sanguíneo.

Fonte: GELSE, POSCHL, AIGNER, 2003; OLSEN et al., 2003.

As principais aplicações de colágeno como sistemas de administração de fármacos são proteções de colágeno em oftalmologia, esponjas para queimaduras / feridas e associações de lipossomas e colágeno para entrega transdérmica e sustentada de drogas (NUNES et al., 2010). Essa extensa aplicação ocorre em função da perfeita biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade biológica apresentada por esta proteína (BARRETO et al., 2013; ZAO et al., 2015). No mercado já existem curativos a base de colágeno, conforme na Tabela 02.

**Tabela 02:** Membranas de colágeno comercialmente disponíveis

<b>Curativo</b>	<b>Composição</b>	<b>Aplicação</b>
Alloderm™	Derma de Acellular de origem de pele cadavérica.	Auto-enxerto na reconstrução de feridas de queimaduras devido à sua origem humana. (Kearney 2001)
Integra™	GAGs de colágeno e tubarão bovino.	Enxertos de pele de espessura parcial; tratamento de úlceras nas pernas e ferimento de feridas graves. (Fitton et al., 2001).
Promogram®	Colágeno animal (55%) com celulose regenerada oxidada (45%).	Absorve proteases em excesso da superfície da ferida (Schönfelder et al., 2005).
Puraply®	Colágeno porcino de tipo I reconstruído.	Feridas de espessura parcial e total incluindo feridas crônicas, sítios doadores e para cirurgia de MOHS (Sanjay et al., 2009).
Fibrocol Plus®	Colágeno animal 90% com um alginato 10%.	Feridas de espessura parcial, úlceras venosas, feridas traumáticas agudas, queimaduras de segundo grau.
Apligraf™/Graftskin™	Fibroblasto humano e colágeno de tendão bovino.	Úlceras de perna venosa e úlceras de pé diabético (Curran e Plosker 2002).
Orcel™	Queratinócitos epidérmicos humanos e fibroblastos dérmicos cultivados em esponja de colágeno bovino tipo I.	Excesso cirúrgico agudo (Still et al., 2003).

Fonte: VASCONCELOS, CAVACO-PAULO, 2011.

Atualmente, o uso do colágeno varia desde revestimento de prótese vascular de amplo calibre até suporte à orientação das células nervosas crescentes (CARDOSO et al., 2017). Contudo, os substitutos dérmicos comercialmente disponíveis a base de colágeno, ainda que muito utilizados na prática clínica tem como desvantagem a baixa força mecânica do colágeno, o que pode interferir nos seus efeitos biológicos, bem como os resultados de reparação (ZAO et al., 2015; WANG et al., 2016).

Entretanto, de acordo com Chaudry et al. (1997), modificações químicas em matrizes colagênicas podem representar alternativas de elevado potencial para refinar ou mesmo modificar propriedades nativas do colágeno, sejam elas mecânicas ou físico-químicas, para atender necessidades específicas na área de biomateriais. Dinga, Zhang e Lia (2015)

apontam que uma das desvantagens dos filmes puros de colágeno consiste na superfície áspera e na baixa termoestabilidade que limitam as suas aplicações, por isso há desenvolvimento de misturas de colágeno com outros polímeros naturais ou sintético. Desta forma, eles prepararam uma blenda de colágeno/HPMC comprovando melhoria nas propriedades mecânicas e térmicas, bem como a hidrofobicidade comparado ao filme puro de colágeno, em função das ligações de hidrogênio e emaranhamento entre colágeno e as moléculas de HPMC, sendo que a utilização do PEG 1500 apurou o estiramento e “suavidade” do filme.

Para melhorar a estabilidade mecânica da membrana de quitosana-colágeno (CCS), Wang et al. (2012) desenvolveram uma malha de urdidura com fios poli (L-lactido-co-glicolido) (PLGA) e incorporaram a CCS para obter um suporte híbrido, cujos resultados indicaram que PLGA/CCS confere força mecânica melhorada e uma microestrutura porosa estável. Quando transplantado para feridas, o PLGA/CCS resistiu à contração da ferida e promoveu a formação de novos tecidos. Wang et al. (2016) tomando o estudo anterior de ponto de partida, incrementaram a membrana com poliuretano (PU), verificando que a microestrutura e a estabilidade mecânica de PU-PLGA/CCS facilitaram ainda mais a regeneração tecidual, pois a camada dérmica de PU-PLGA/CCS combina as vantagens dos biomateriais biológicos e sintéticos, e alcança um equilíbrio entre porosidade, biocompatibilidade e resistência mecânica.

Paunica-Panea et al. (2016) desenvolveram *scaffolds* de colágeno e dextrana adicionados de partículas de ZnO. As partículas de ZnO foram capazes de reduzir a absorção de água para ambas as matrizes de colágeno e de colágeno/dextrana, pois causaram a diminuição dos tamanhos de poros e um aumento na uniformidade, além de causarem efeito farmacológico benéfico.

Yamano et al. (2014) aplicaram fator de crescimento/diferenciação 5 (GDF-5) em membrana de colágeno para processo de reparo ósseo, uma vez que ele é essencial para o desenvolvimento normal e formação de osso, articulações, tendões e ligamentos no esqueleto axial e apêndice, e comprovaram que o GDF-5 induziu nova formação óssea de uma maneira dose-dependente. Assim, a membrana de colágeno com GDF-5 pode levar a uma melhora no tratamento clínico atual de defeitos ósseos para terapia periodontal e de implante.

Estudos tem relatado a inserção de produtos naturais na elaboração de membranas bioativas. Dentre os produtos naturais utilizados, a própolis vermelha tem sido bem explorada. Albuquerque-Júnior et al. (2009) verificaram que a incorporação de extrato deste

produto aos filmes de colágeno, aparentemente, estimulou a fibroplastia cicatricial, sem efeitos tóxicos. Assim, esses filmes podem ser considerados promissores para oclusão da ferida e reparação de tecidos. Ainda, Barreto (2009) desenvolveu membrana de colágeno tipo-I com própolis vermelha e o estudo indicou que o produto natural propiciou melhorias importantes no reparo cicatricial e as características físico-químicas e estruturais dos biofilmes permitiram seu emprego em uma larga faixa de condições clínicas onde haja desnudamento epitelial ou ulceração com perda de substância, sem possibilidade de coaptação de bordas.

As membranas de colágeno contendo genipina e própolis vermelha obtidas por Rezende Neto (2011) mostraram características aceitáveis para sua aplicação no tratamento de feridas abertas, pois induziram maior índice de contração da ferida, reduziram a magnitude e aceleraram a cronificação do processo inflamatório e aumentaram o grau de colagenização cicatricial nos estágios iniciais do reparo. Elas também propiciaram uma melhor organização das fibras colágenas nos estágios tardios do reparo. A reticulação com genipina conferiu melhores condições de uso devido à maior resistência à manipulação. Situação semelhante foi obtida por Souza (2013), onde a modificação do colágeno melhorou as propriedades mecânicas da membrana bioativa e com a incorporação do extrato de própolis vermelha incrementou a resposta fibroblástica e acelerou a maturação epidérmica, bem como a neoformação de anexos dérmicos.

Pesquisas voltadas para o melhoramento de membranas de colágeno têm se concentrado em incorporar compostos bioativos (fármacos sintéticos ou produtos naturais) a fim de que haja uma liberação controlada do produto diretamente no tecido danificado. Isto mantém a substância em níveis constantes no organismo, implicando em maior eficiência do agente devido à aplicação ser diretamente no sítio de ação, com altas concentrações localizadas e reduzindo ou evitando efeitos colaterais sistêmicos e menor frequência de administração do agente ativo, aumentando o conforto do paciente e eficácia do tratamento (GOPINATH et al., 2004; LEE, SINGLA e LEE, 2001).

### **3.4 Pólen Apícola**

Estudos recentes demonstram que produtos naturais como frutas, vegetais, plantas medicinais e ervas têm boas propriedades farmacológicas e podem ser utilizados como medicina complementar e alternativa para o tratamento de muitas doenças humanas (YILMAZ et al., 2016; KARASAWA; STEYGER, 2015). Um produto bem conhecido na

medicina tradicional é o pólen apícola e seus usos se expandiram da área de alimentos saudáveis para a médica (MOHDALY et al., 2015).

O pólen apícola é uma aglutinação de vários polens florais coletados pelas abelhas operárias e misturados com néctar e secreções hipofaríngeas (enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -glicosidase), resultando na formação de “bolotas”, as quais diferem do pólen colhido das plantas (COUTO, COUTO, 2006). Este produto é rico em proteínas, aminoácidos essenciais, óleos, ácidos graxos, minerais, enzimas e co-enzimas, carboidratos e flavonóides, carotenóides e fitoesteróis (XU et al., 2009; CAMPOS et al., 2003). Além disso, conta com um aporte considerável de sais minerais (cálcio, cobre, ferro, magnésio, iodo, selênio, estrôncio, estanho, boro, flúor, fósforo, potássio, enxofre, alumínio, manganês, e zinco) e vitaminas (A, do complexo B, C, D, E,  $\beta$ -caroteno), além de ser uma fonte preciosa de oligominerais (cobalto, níquel, silício, titânio, etc.) com mais de vinte elementos (RIBEIRO, SILVA, 2007; FERREIRA, 2012). Considerado por isso um alimento completo (FEAS et al., 2012).

Efeitos terapêuticos e protetores são associados ao conteúdo de compostos funcionais, como os polifenóis, que são as principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante do pólen apícola. Os grupos mais relevantes presentes no pólen são ácidos fenólicos e flavonoides, e sua atividade biológica está condicionada a sua estrutura química específica (RZEPECKA-STOJKO et al., 2017). Ao fazer suas considerações sobre os constituintes do pólen, Menezes (2009) utilizou-se de outras referências para embasar sua afirmação de que dentre os carotenoides encontrados geralmente no pólen apícola são predominantes o  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno e em menor quantidade criptoxantina, xantofilas e flavoxantina. Ressalta-se que o perfil de flavonoides e fenólicos, tanto em quantidade como em variedade, está diretamente relacionado aos tipos polínicos florais que compõem o pólen de abelha. Rocha (2013) em sua revisão cita trabalhos que identificaram os principais compostos fenólicos presentes no pólen apícola, apontando flavonoides glicosilados e ácidos hidroxicinâmicos. LeBlanc et al. (2009) identificou os seguintes compostos fenólicos no pólen apícola dos Estados Unidos: ácidos *p*-hidroxibenzóico, *p*-cumárico, vanílico, gálico e ferúlico.

O grupo de compostos bioativos, representado largamente pelos compostos fenólicos ou polifenóis, compreende em torno de 8 mil estruturas diferentes conhecidas. A essas substâncias estão associadas atividades: anticarcinogênica, anti-inflamatória, anti-aterogênica, anti-trombótica, imunomoduladora e analgésica. Por suas características químicas, foram genericamente divididas em 10 tipos: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas e

isocumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides e ligninas, sendo os flavonoides a classe mais importante de polifenólicos (GOMEZ-CARAVACA et al., 2006). Aos flavonoides associados ao pólen apícola, atribuiu-se à quercetina a atividade anti-inflamatória, ao campferol e seus derivados a redução da hiperplasia prostática e à miricetina o combate das alergias (ROCHA, 2013).

Assim como outros produtos de apicultura, o pólen ganhou maior atenção em virtude da potencial aplicação de suas propriedades terapêuticas, anti-bacteriana e antifúngica (GARCÍA et al., 2001), anti-cariogênica (ALMAS et al., 2001) e pelos efeitos imunomoduladores (GEBARA et al., 2002; TOHAMY et al., 2014). Prevenção de problemas de próstata, arteriosclerose, gastroenterite, doenças respiratórias, dessensibilização de alergias, melhoria dos sistemas cardiovascular e digestivo, imunidade corporal e atraso no envelhecimento (MOHDALY et al., 2015; ESTEVINHO et al., 2012), melhora dos sintomas do autismo (AL-SALEM et al., 2016) e ação ansiolítica (KARAMPOUR, HEMMATI, MALMIR, 2016).

Pascoal et al. (2014) realizaram extensivos testes com pólen apícola comercial, verificando sua atividade biológica nos aspectos antimicrobiano, anti-inflamatório, antimutagênico e antioxidante. Observaram maior ação dos extratos frente às bactérias Gram-positivas, especialmente das estirpes de referência – mais sensíveis do que o isolado a partir de fluidos biológicos –, sugerindo o uso combinado com antibióticos. Seus testes ratificaram a atividade antígeno-tóxica substancial do pólen apícola, uma vez que todos eles diminuíram as frequências de conversão do gene. Sua pesquisa indicou boa atividade antioxidante.

Basim, Basim e Ozcan (2006) testaram a atividade antimicrobiana do pólen apícola com várias bactérias fitopatogênicas, observando que dentre todo o grupo, a *Agrobacterium tumefaciens* mostrou-se mais sensível a uma concentração de 1/5 do extrato de pólen. Fatrcová-Šramková et al. (2013) também comprovaram a ação, em maior ou menor grau, do pólen, cuja origem botânica era conhecida, contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella entérica* CCM 4420; *Escherichia coli*. Entretanto, Cabrera e Montenegro (2013) esclarecem que essa ação depende da origem botânica. Isto pode ser confirmado pelo trabalho de Carpes et al. (2009) que não encontraram ação antimicrobiana de polens da região sul do Brasil.

Frigerio (2009), em seu estudo sobre a bioatividade do pólen apícola, citou trabalhos sobre o efeito de extratos de pólen apícola de *Eucalyptus globulus* e de *Salix atrocinerea* em ratos, cujos resultados mostraram que ambas as espécies têm propriedades antidiarréicas,

reduzindo em cerca de 30% os excrementos diarreicos. Este estudo concluiu que a atividade anti-diarréica do pólen apícola das espécies testadas pode ser devida aos constituintes polifenólicos, especialmente à quercetina e seus derivados, embora outros compostos possam ter um papel nesta atividade e ser também responsáveis pelas diferenças nos resultados.

Akkol et al. (2010) testando a atividade *in vivo* de um mix de pólen apícola comercializado na região da Turquia, verificaram ação antinociceptiva e anti-inflamatória a dosagens de 500 mg/Kg administrado oralmente, sem causar danos gástricos ou toxicidade aguda. Os principais flavonoides encontrados foram a quercetina, campferol e mirecetina glicosídeos, enquanto os ácidos fenólicos foram os derivados de ácido cinâmico.

Tohamy et al. (2014) testaram extrato aquoso de pólen e própolis contra os efeitos histológicos e genotóxicos de cisplatina, observando no pólen maior atividade potencial para melhorar os efeitos colaterais da administração de cisplatina, uma vez que seus efeitos na diminuição do marcador de peroxidação lipídica foram significativamente maiores e sua capacidade de eliminar radicais livres foi melhor do que os da própolis.

El-Asely, Abbass e Austin (2014) constataram que a incorporação de pólen apícola na dieta de tilápias promoveu melhorias na taxa de crescimento, na imunidade não específica e foi benéfica para o controle de infecções por *Aeromonas hydrophila*.

Martins (2010) em seu estudo também relacionou uma série de benefícios atribuídos ao consumo do pólen apícola, foram eles: capacidade de amenizar os sintomas de hiperplasia prostática benigna e prostatite crônica; melhorar a função hepática; proteger o fígado dos efeitos de irradiação por raios-X e de algumas substâncias tóxicas; diminuir os níveis de lipídeos séricos em animais e em humanos; além de reduzir a formação da placa aterosclerótica induzida experimentalmente em coelhos.

Martín-Muñoz et al. (2010) afirmaram que o uso do pólen apícola como suplemento alimentar tem sido recomendado para o tratamento de várias doenças infecciosas e para doenças alérgicas, mas foi encontrado casos em que ele foi responsável por reações anafiláticas. Isto porque o pólen de abelha é uma mistura heterogênea de polens de plantas de diferentes espécies, e seu papel como desencadeador de crises alérgicas manifestadas após a sua ingestão ou de outros produtos das abelhas tem sido demonstrado quando o fator alergênico compõe o mesmo.

Os estudos de Feas et al. (2012) sugerem que, em função de o pólen apícola representar uma boa fonte de compostos fenólicos, possa ser útil na prevenção de doenças em que os radicais livres estão implicados. Já os resultados da pesquisa de Omar et al. (2016)

sugerem que o extrato de pólen de abelha sem ferrão da Malásia pode ser usado para complementar tratamentos quimioterápicos devido à sua atividade antiproliferativa e sua capacidade de aumentar o efeito do agente de quimioterapia, mesmo em baixa concentração, pois foi observado efeito sinérgico com a cisplatina.

Huang et al. (2017) constataram que o extrato de pólen apícola de magnólia-chinesa (*Schisandra chinensis*) reduziu os danos causados por cisplatina no fígado e nos rins, reduziu o nível de estresse oxidativo, inflamação e apoptose e melhorou a capacidade antioxidante, antiinflamatória e antiapoptótica do corpo. Reforçando a importância do uso do pólen para fins medicinais.

Os resultados de Maruyama et al. (2010) indicam que o efeito anti-inflamatório do extrato de etanol do pólen age por inibição da produção de NO, além da atividade inibitória da COX-2. Alguns flavonóides incluídos no pólen de abelha podem parcialmente participar de alguma ação anti-inflamatória.

Mohamed et al. (2018) trataram ratos macho diabéticos com suspensões de pólen apícola e pólen de palmeira constatando potencial papel protetor contra a disfunção do eixo testicular hipofisário induzido pela diabetes e as alterações deletérias histológicas testiculares em associação com ações anti-hiperglicêmicas através de suas propriedades antioxidantes e sua eficiência para melhorar o nível de insulina no sangue e a função das células beta.

Komosinska-Vassev et al. (2015) referenciam esse efeito hipoglicemiante do pólen como decorrente da presença de ácidos graxos insaturados, fosfolipídios e fitoesteróis. Citam também estudos que indicam redução da capacidade de agregação plaquetária e aumento da atividade do sistema fibrinolítico e efeito antiaterosclerótico que protege contra doenças cardíacas e traços cerebrais.

O pólen apícola é uma fonte considerável de compostos com potencial de proteção da saúde, certa concentração de fitoesteróis e é rico em fitoquímicos como compostos fenólicos. (ALICIC et al., 2014). A ingestão diária de pólen de abelha pode regular as funções intestinais, efetivamente reduzir a fragilidade capilar e tem efeitos benéficos sobre o sistema cardiovascular, visão e pele (PIETTA, 2000).

Os polifenóis presentes no pólen de abelhas e outros produtos de abelhas contêm atividades antioxidantes e antiproliferativas que podem regular a proliferação celular e induzir a apoptose (PREMRATANACHAI; CHANHAO, 2014). O efeito cicatrizante do pólen apícola também foi testado com sucesso por Olczyk et al. (2016) a partir de pomada a base de

pólen, a qual demonstrou reepitelização e fechamento da ferida de queimadura, com efetiva atividade antimicrobiana.

O pólen apícola possui forte potencial para o desenvolvimento de produtos com fins farmacológicos, em virtude de todas as propriedades supracitadas. Assim, foi desenvolvida uma biomembrana contendo extrato hidroetanólico liofilizado de pólen apícola polifloral, a qual foi submetida à avaliação genotóxica, a fim de atestar a segurança de uso da mesma, pois é fundamental que o produto não ofereça risco de alterações genômicas.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Pólen apícola

#### 4.1.1 Análise polínica

As amostras de pólen apícola (desidratadas) foram obtidas diretamente no apiário produtor na zona rural da cidade de Esperantina (PI), situado nas coordenadas 03° 54' 06" S 42° 14' 01" O, nos períodos de produção entre os meses de fevereiro a maio de 2017, sempre no turno da manhã. O acesso foi cadastrado junto a plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (anexo I).

A análise polínica procedeu-se no Laboratório de Micromorfologia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana – BA, seguindo a metodologia descrita por Santos (2011). O pólen desidratado (4,0 g) foi desagregado em água destilada morna (20 mL) por 2 h, aproximadamente, agitando-se com bastão de vidro até a completa desagregação das bolotas. Depois, essa preparação foi centrifugada a 250 rpm por 1 min. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 20 mL de etanol 50% ao sedimento, que permaneceu sob maceração por 3 h. Ao final desse tempo, realizou-se nova centrifugação para separação do álcool. Esta fase de preparo foi finalizada com a adição de etanol 95% ao sedimento polínico, para a sua desidratação, sendo centrifugado para remoção completa do etanol.

Os sedimentos polínicos foram submetidos ao método de acetólise (ERDTMAN, 1960), sendo tratado com uma mistura de ácido sulfúrico e anidrido acético na proporção de 1:9. Em seguida, o sedimento resultante foi lavado com água destilada por duas vezes, com as respectivas centrifugações, e acrescentado água glicerinada (50%) por um intervalo de tempo de 1-24 horas, procedendo-se à nova centrifugação e com o sedimento polínico residual, foram confeccionadas as lâminas para as análises palinológicas em microscópio.

A partir de cada amostra foram montadas cinco lâminas (corada com safranina), nas quais foram contados os grãos de pólen, pelo menos 500 por lâmina, para estabelecer a frequência dos tipos de pólen. Os tipos polínicos foram identificados em sua afinidade botânica por comparação com lâminas da palinoteca do Laboratório de Micromorfologia Vegetal (Universidade Estadual de Feira de Santana).

#### 4.1.2 Preparação e caracterização dos extratos etanólicos do pólen apícola

Preparou-se extrato bruto do pólen apícola com etanol 75%, na proporção pólen:solvente de 1:5 (m/v), mantidos em maceração por 24 h à temperatura ambiente

(~28°C), no escuro. Transcorrido o tempo, o sobrenadante foi filtrado e concentrado em rotaevaporador a 45°C sob vácuo, conforme o descrito por Zhang et al. (2015).

Uma alíquota do extrato foi retirada para realização dos testes de fenólicos totais, flavonoides, para os testes de atividade antioxidante (FRAP, DPPH e ABTS) e atividade antimicrobiana empregou-se o concentrado rotaevaporado liofilizado, armazenado em eppendorff e acondicionado em freezer, protegido da luz até o uso.

#### 4.1.2.1 *Análise de fenólicos totais*

Seguiu-se o método espectrofotométrico utilizando-se o reagente de *Folin Ciocalteu* descrito por Slinkard e Singleton adaptado por Vieira et al., 2011. Para a construção da curva de calibração foi utilizado o ácido gálico como padrão, nas concentrações de 5 a 240  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e a partir da equação da reta obtida por regressão linear efetuou-se o cálculo do teor de fenólicos totais. Os procedimentos gerais acompanharam o que foi descrito por Zhang et al. (2015).

Juntou-se 0,5 mL do extrato a 0,5 mL do *Folin Ciocalteu* 20% (v/v), deixando reagir por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução de carbonato de sódio (0,2 g mL<sup>-1</sup>) e a mistura foi incubada ao abrigo da luz por 1 hora, a temperatura ambiente. A quantificação de fenólicos totais foi feita pela interpolação na curva padrão de ácido gálico e os valores expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de amostra. O branco foi feito com o solvente empregado na elaboração dos extratos (usando a mesma quantidade da amostra) e subtraiu-se dos resultados finais com a amostra para não superestimar os resultados, sempre em triplicata.

#### 4.1.2.2 *Determinação de flavonoides totais*

Usou-se o método colorimétrico, como descrito por Zhishen, Mengcheng, Jianming (1999) adaptado. Tomou-se 0,5 mL do extrato, adicionou-se 2,2 mL de água destilada e 0,15 mL de NaNO<sub>2</sub> 5% (m/v) e homogeneizou-se em vórtex. Após 6 minutos foi adicionado 0,15 mL de solução de AlCl<sub>3</sub> 10% (m/v), homogeneizou-se em vortex. Após 6 minutos, foi adicionado 2 mL de solução de NaOH 4% (m/v), homogeneizado e aguardou-se por 15 min.

A leitura foi feita em espectrofotômetro a 510 nm, utilizando a água destilada como branco. A quantificação de flavonoides totais se fez pela interpolação na curva padrão de catequina e os valores são expressos em miligramas de equivalente de catequina por g de amostra.

#### 4.1.2.3 Determinação da atividade antioxidante via DPPH

Usou-se o método de Brand-Willians et al. (1995) com algumas adaptações de Zhang et al. (2015). Inicialmente, 0,2 mL do extrato de pólen em várias concentrações (5,0-40,0 mg mL<sup>-1</sup>) foi misturado com 2 mL de etanol e 1,8 mL de água e 2 mL de solução alcoólica de DPPH (0,2 mmol L<sup>-1</sup>). A mistura foi agitada e mantida por 30 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente (~28°C). A absorbância foi medida em 517 nm em espectrômetro UV-vis.

A absorbância do controle foi medida usando 1,8 mL de água e 2 mL de solução de DPPH. O cálculo da atividade de proteção seguiu a formula:

$$\%AA = \frac{Abs_{am} - Abs_{br}}{Abs_{am}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

#### 4.1.2.4 Atividade antioxidante método ABTS

Método foi executado segundo Re et al. (1999), no qual a intensidade da cor verde/amarelo foi medida a 734 nm usando espectrofotômetro modelo SP-220. Adicionou-se 40 µL do extrato reduzido em rotaevaporador a 1960 µL do radical ABTS, homogeneizando-se bem em vórtex. Foi deixado em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e a descoloração verde para amarela foi medida em 734 nm. O branco foi feito com os mesmos solventes das amostras e em triplicata. A quantificação da atividade antioxidante pelo método ABTS se fez pela interpolação na curva padrão de Trolox e os valores foram expressos em mM de equivalente de Trolox por g de amostra.

#### 4.1.2.5 Atividade redutora FRAP

Para esta análise, seguiu-se a metodologia descrita por Arnous, Makris e Kefalas (2002). Foi pipetado 0,2 mL da solução de cloreto férrico 3 mM para os tubos de ensaio; foram preparados duas provas em branco, isto é, 0,2 mL da solução de cloreto férrico 3mM e 0,2 mL do solvente utilizado para a extração da amostra; adicionou-se 0,2 mL do extrato da amostra em cada tubo de ensaio, homogeneizou-se em vortex e iniciou-se a cronometragem do tempo. A adição foi realizada em intervalos de 1 minuto entre os tubos; a reação foi mantida durante 30 minutos em banho-maria a 37°C; retirou-se do banho e adicionou-se 3,6 mL da solução de TPTZ preparada recentemente; após 10 minutos da adição do TPTZ, mediu-se a absorbância a 620nm, sempre em triplicata.

#### 4.1.2.6 Identificação dos compostos fenólicos por CLAE-DAD/EM-ESI

Os principais flavonóis e ácidos fenólicos foram separados e identificados por CLAE-DAD-EM-ESI usando coluna de fase reversa Luna C18(2) HST (100 × 3.0 mm, 2,5 µm; Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Como fase móvel usou-se água acidificada com ácido fórmico 0,1% (solvente A) e acetonitrila (solvente B). A separação ocorreu sob gradiente a uma taxa de fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, com gradiente programado de 22 min, iniciando com 5% de acetonitrila, seguindo para 8% de acetonitrila em 5 min, com aumento para 15% em 8 min, mantendo nessa proporção por 2 min, em seguida novo aumento para 20% de acetonitrila em 12 min, a proporção foi de acetonitrila aumentando novamente para 35% em 15 min e mantendo a 3min, finalmente houve uma diminuição na proporção de acetonitrila para 5%, que foi mantida por 2 min.

O sistema cromatográfico foi da Shimadzu (modelo LC-20ADX Proemnience, Kyoto, Japan) equipado com duas bombas de alta pressão e um detector de arranjos de diodo acoplado ao espectrômetro de massas Bruker (modelo Amazon Speed, Billerica, MA, EUA) com analisador de íons e ionização por electrospray (ESI) operado em modo negativo e controlado por software HyStar, nas seguintes condições: voltagem capilar 3,5 kv; temperatura 230°C; fluxo de gás de dessolvatação (N<sub>2</sub>), 360 L/h; intervalo m/z de 100-1000. As amostras foram injetadas em triplicata e os flavonoides e ácidos fenólicos foram identificados correlacionando relação massa:carga do íon (m/z) e principais fragmentos com dados referenciados na literatura.

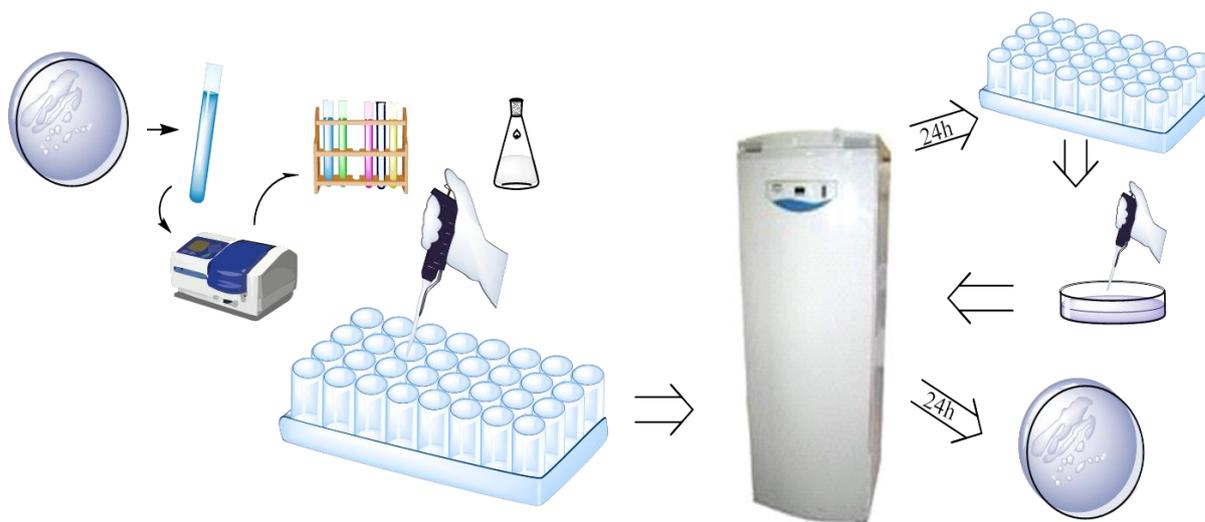
#### 4.1.2.7 Atividade antimicrobiana

Para os testes de atividade antimicrobiana dos extratos de pólen apícola foram escolhidas espécies Gram-positivas, Gram-negativas e de leveduras: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, respectivamente, cepas puras ATCC obtidas juntos as coleções da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As cepas foram ressuspensas em solução salina 0,9%, cuja concentração de células foi ajustada para 0,5 na escala McFarland, confirmada por leitura espectrofotométrica a 580 nm para bactérias e 640 nm para leveduras em espectrofotômetro Biospectro modelo SP-22.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) – a menor concentração do extrato de pólen apícola capaz de inibir o crescimento visível do inoculo – contra os microrganismos selecionados, foi realizada de acordo com a adaptação de compêndios internacionais compilados a partir de Campos et al. (2014) e Choudhari et al. (2012), onde

utilizou-se caldo Mueller-Hinton como meio nutritivo e uma diluição seriada do extrato em água destilada esterilizada ( $0,67$  a  $80 \text{ mg mL}^{-1}$ ), com base verificado na literatura científica. Prepararam-se três tubos para cada microrganismo e foi preparado um grupo contendo a mistura de todos os microrganismos, denominado de POOL, uma forma de simular a presença dos vários microrganismos presentes na pele. Ao caldo foram adicionados  $0,1 \text{ mL}$  da suspensão de microrganismos e  $0,1 \text{ mL}$  das diluições do extrato, em seguida os tubos contendo o caldo nutritivo, microrganismo e extrato foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas em estufa incubadora modelo B.O.D. CT-705 Cientec. Todas as diluições dos extratos e microrganismos foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em  $\text{mg mL}^{-1}$ .

**Figura 03:** Esquema representativo do procedimento experimental para realização da análise de atividade antimicrobiana por CIM



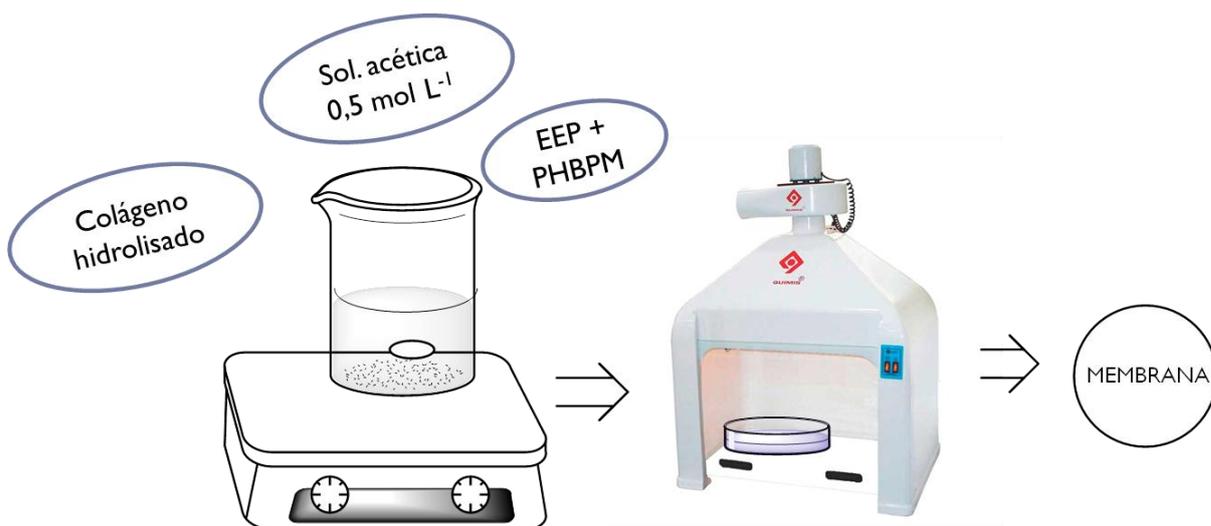
#### 4.2 Obtenção da membrana

Para a preparação das membranas utilizou-se colágeno hidrolisado, adquirido no comércio local, o qual foi disperso em ácido acético  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  com agitação magnética a  $500 \text{ rpm}$  em temperatura ambiente ( $\sim 28^\circ\text{C}$ ). Em seguida, adicionou-se o extrato liofilizado do pólen apícola, dissolvido em polímero hidroxilado de baixo peso molecular, ambos em quantidade proporcional ao peso do colágeno seco. A dispersão polimérica foi misturada à composição e mantida em agitador magnético para a completa homogeneização, mantido ainda a temperatura ambiente ( $\sim 28^\circ\text{C}$ ), conforme descrito por Rezende Neto (2011).

As membranas foram produzidas por *casting process*, isto é, desidratação de uma solução filmogênica, onde a dispersão polimérica foi vertida em placa de petri de vidro e

postas em capela de exaustão contínua até a formação da biomembrana (SOUZA, 2013). Cabe ressaltar que por questões de o produto estar em processo de proteção inventiva, as proporções exatas foram omitidas (anexo III).

**Figura 04:** Esquema representativo do procedimento experimental para realização de confecção das membranas de colágeno



#### 4.3 Estudos *in vivo* da membrana

Esta pesquisa seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estando de acordo com critérios propostos pela Lei n° 11.794/2008: experimentação animal. O projeto de pesquisa foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de animais da Universidade Estadual do Piauí, sob protocolo n° 15486/2015 (anexo I), somente após a sua aprovação, a coleta de dados foi iniciada.

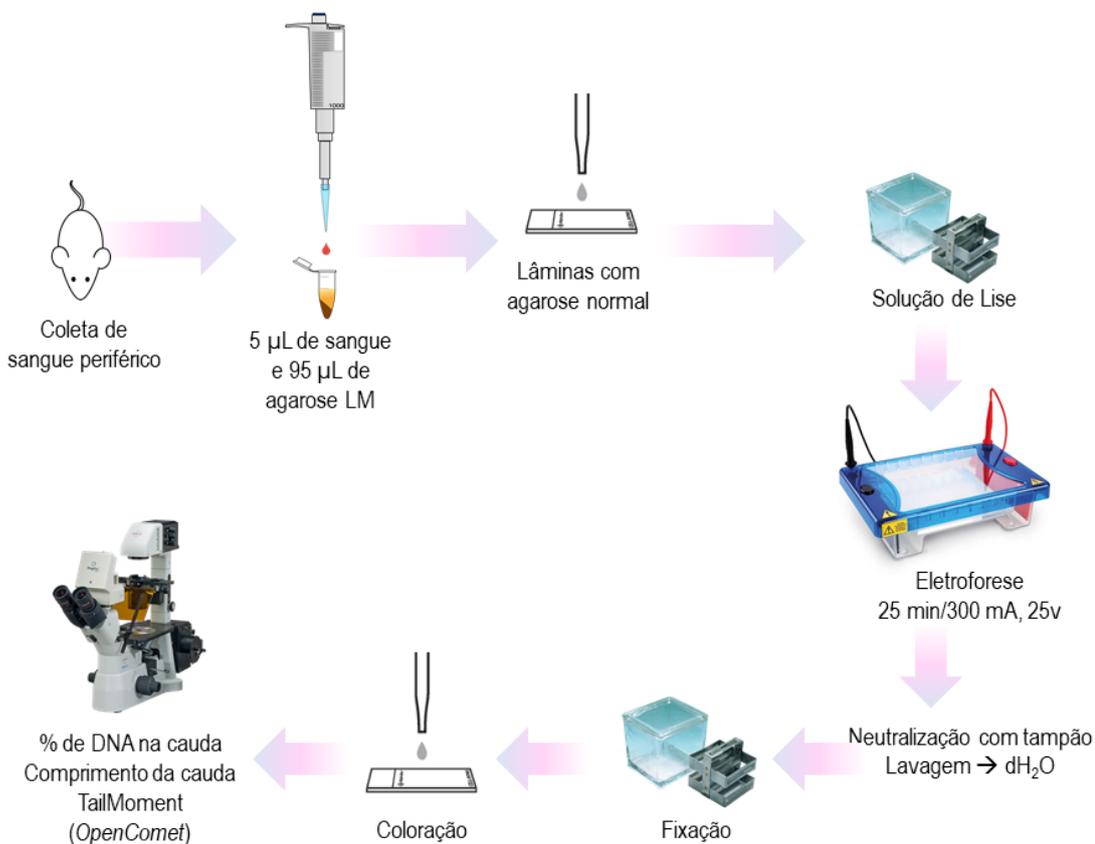
Para os testes de genotoxicidade foram utilizados ratos adultos da espécie *Rattus norvegicus* variedade Wistar, machos e fêmeas, pesando entre 280-300 g, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Piauí, mantidos em condições de temperatura e umidade controladas, ciclo claro-escuro de 12 h, iniciando-se às 6 h. Os mesmos foram abrigados em suas gaiolas moradias (5/gaiola) com livre acesso à água e alimentação.

Para os testes de cicatrização foram utilizados camundongos *Mus musculus* Swiss, machos, pesando entre 100-180 g, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Piauí, mantidos em condições de temperatura e umidade controladas, ciclo claro-escuro de 12 h, iniciando-se às 6 h. Os mesmos foram abrigados, individualmente, em gaiolas moradias (1/gaiola) com livre acesso à água e alimentação.

#### 4.3.1 Ensaio cometa alcalino

Para realização do ensaio cometa, foi utilizado o procedimento padrão alcalino descrito por Tice et al. (2000), conforme esquema apresentado na Figura 05. Utilizou-se um total de 24 animais, divididos em 4 grupos de 6 indivíduos: grupo tratado, que recebeu implante intraperitoneal de membrana a base de pólen apícola, a qual foi implantada através de uma Laparotomia, onde empregou-se anestesia dissociativa a base de ketamina (1,0ml/kg) e xilazina (1,1ml/kg) intramuscular; grupo da membrana sem extrato, que seguiu a mesma forma de inclusão do grupo tratado; grupo controle parâmetro negativo, que recebeu água destilada; e grupo controle parâmetro positivo, que empregou ciclofosfamida na dosagem de 50 mg/kg de peso corpóreo. Nos quatro grupos foi observado o grau de dano (4h) e reparo (24h).

**Figura 05:** Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio cometa alcalino



Fonte: Tice et al., 2000 (adaptada)

Após cada coleta de sangue periférico dos animais, 5  $\mu\text{L}$  de células sanguíneas (sangue heparinizado) foram pipetados e misturados a 95  $\mu\text{L}$  de agarose *Low Melting* e espalhados sobre lâminas embebidas em gel de agarose e cobertas com lamínulas. Foram confeccionadas

2 lâminas por animal, em cada coleta. As lâminas foram inseridas em solução de lise por 2 horas. Após este período, as lâminas foram imersas em tampão de pH alcalino (>13) por 25 minutos. Este processo permitiu o desenovelamento das cadeias de DNA por meio do rompimento das estruturas secundária e terciária, presentes no núcleo celular. Após o desenovelamento, as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica em cuba de eletroforese, que induziu a migração dos fragmentos de DNA no sentido do ânodo, durante 25 minutos, a 25 volts e 300 mA. Todas estas etapas foram realizadas sob luz indireta, fraca para evitar danos adicionais ao DNA.

As lâminas foram neutralizadas logo após a eletroforese com tampão Tris 0,4 M, pH 7.5, fixadas, lavadas com água destilada e secas por 12 h. Após hidratação durante 5 minutos em água destilada, as lâminas foram coradas com Gelred e analisadas ao microscópio de fluorescência em aumento de 40 x. Avaliou-se a extensão dos danos ao DNA a partir do comprimento da distância de migração do DNA a partir do centro do nucleóide, percentagem de DNA na cauda e comprimento da cauda por meio do *software* Opencomet v.1.3.1 (GYORI et al., 2014). Todo o protocolo foi baseado em publicações anteriores (COLLINS et al., 2008; AZQUETA, COLLINS, 2013).

#### 4.3.2 Teste do micronúcleo

Foram utilizados 30 animais, divididos em três grupos: grupo experimental, que recebeu o implante intraperitoneal de membrana a base de pólen apícola, a qual foi implantada através de uma Laparotomia, que seguiu o mesmo procedimento do teste do cometa; grupo controle parâmetro negativo água destilada; grupo controle positivo, ciclofosfamida 50 mg/kg de peso corpóreo, via Intraperitoneal. Dos dez animais de cada grupo, cinco foram utilizados para exposição aguda (48h) e 05 para exposição crônica (72h).

A coleta foi realizada imediatamente após a eutanásia dos animais, por deslocamento cervical. Nesse processo utilizou-se seringa de 01 mL preenchida com soro fetal bovino, aue foi introduzida na abertura da extremidade do fêmur, promovendo a lavagem do componente medular em direção à outra extremidade, colhido em tubo Falcon, previamente marcado com o código do animal. O material da medula foi ressuspensionado em soro fetal bovino, até atingir uma homogeneidade.

Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1.000 rpm, descartando o sobrenadante. Adicionou-se 0,5 mL de soro fetal bovino à amostra, suspendendo-a até a homogeneização. As lâminas com os esfregaços foram preparadas a partir de 02 gotas da suspensão; estas lâminas foram secas ao ar livre e após 24h, elas foram imersas em corante

Giemsa por 3 minutos. Para cada animal foram confeccionadas 2 lâminas, contabilizando-se 2.000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por lâmina. Todo o protocolo foi desenvolvido de acordo com Hayashi et al. (1994) e Hamada et al. (2015).

#### 4.3.3 Ensaio biológico de cicatrização

Para o procedimento cirúrgico, seguiu-se como descrito por Rezende Neto (2011) e Souza (2013), utilizando-se um total de 60 camundongos *Mus musculus* Swiss machos (100 a 180 g) mantidos em gaiolas com cama de maravalha, trocadas diariamente, mantidos à temperatura controlada de 22°C aproximadamente, em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, recebendo água *ad libitum* e dieta padrão. A confecção das feridas foi realizada sob anestesia geral, com injeção intraperitoneal de 0,1 mL/100 g de peso de uma solução composta por 1 mL de quetamina (50 mg) e 1 mL de xilazina (20 mg). O dorso dos animais foi tricotomizado e a antissepsia efetuada com iodopovidona tópico a 1%.

Foram então realizadas feridas cirúrgicas padronizadas com área de 1,0 cm<sup>2</sup>. A profundidade foi determinada através da penetração da parte ativa da lâmina do bisturi, em torno de 5,0 mm. Os animais foram então subdivididos nos seguintes grupos (n=5): CTR (ferida aberta – sem cobertura), CMP (ferida aberta com cobertura de membrana de colágeno com pólen apícola), CP (ferida aberta com cobertura de pomada cicatrizante comercial) CM (ferida aberta coberta com membrana sem extrato).

Após 7, 14 e 21 dias a partir dos procedimentos cirúrgicos, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados por analgesia. Constatada a morte dos animais, foi realizada a remoção do tecido equivalente a área cicatricial com margens de 3,0 mm. Os tecidos removidos foram acondicionados em frascos plásticos contendo formol (10%, pH 7,4) e fixados por 48h.

##### 4.3.3.1 Procedimentos histológicos

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

Para avaliação das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório/reparativo, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE (BARRETO, 2009).

Para a análise qualitativa do colágeno foi obtido fragmento longitudinal de 5 mm do corpo, compreendendo a sutura gástrica. Estas amostras foram conservadas em frascos separados em formol a 10%. Após microtomia, os cortes histológicos foram submetidos à coloração pelo picrossiriusred - F3BA. Para identificação de colágenos maduro (tipo I) e imaturo (tipo III), analisaram-se os cortes histológicos por meio de microscópio óptico, em aumento de 400 vezes, com fonte de luz polarizada.

As imagens foram captadas por uma câmera e transmitidas a monitor colorido, congeladas e digitalizadas por meio de placas. Finalmente, foi realizada a análise das imagens mediante o aplicativo Image Pro-Plus versão 4.5 para Windows (Mídia Cibernética, São Paulo,SP). No sistema RGB (Red, Blue, Green) foram considerados valores para tons de vermelho, amarelo e laranja (colágeno tipo I) e para tons de verde (colágeno tipo III).

Todas as lâminas foram avaliadas sob as mesmas condições de regulação, dentro dos parâmetros exigidos pelo referido aplicativo. Nos cortes histológicos analisados determinou-se o campo microscópico sobre a área de cicatrização e foram obtidas medidas de duas áreas distintas. Em cada uma delas o “software” calculou a percentagem da área ocupada pelas fibras que continha colágeno dos tipos I e III em relação à área total examinada. Considerou-se como medida da percentagem de fibras colágenas, a média das duas áreas analisadas. A partir da medida da percentagem de fibras colágenas foi calculado o índice de maturação de colágeno (IMaC) foi realizado segundo o descrito por Trubian, sendo obtido através da razão percentual de colágeno tipo I pelo Percentual de colágeno tipo III, onde valores maiores do que 1 indicam que a percentagem de colágeno tipo I é maior do que a percentagem de colágeno do tipo III.

#### **4.4 Análise Estatística**

Os dados serão analisados utilizando *One-Way* ANOVA e teste o teste t de Student. Para todos os testes será considerado um nível de significância de 5%. Os resultados serão expressos como médias, desvio padrão das três experiências independentes. O resultado será considerado positivo quando houver um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

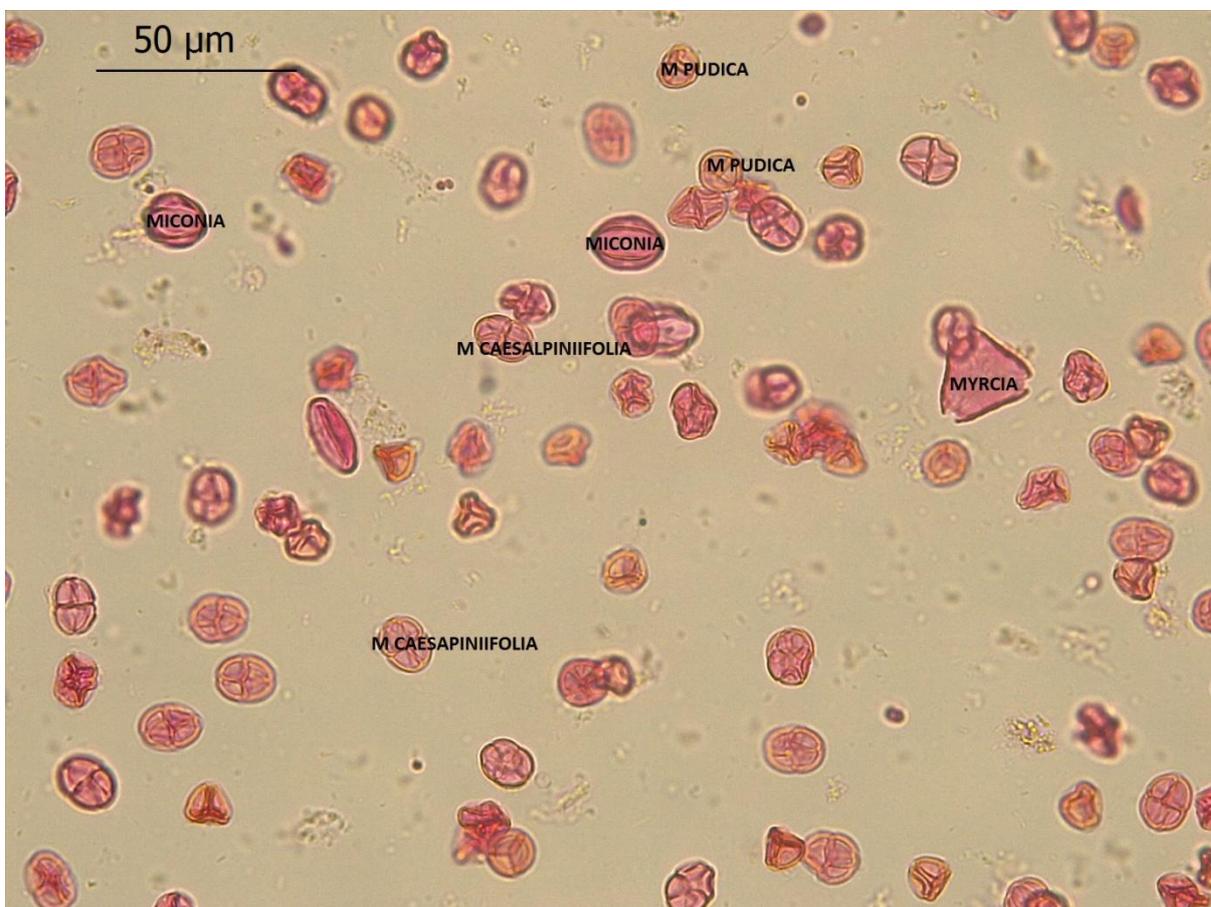
### 5.1 Caracterização do Pólen Apícola

#### 5.1.1 Identificação polínica

No processo de caracterização de amostras de pólen apícola, a análise polínica é de grande importância, especialmente levando em consideração dois aspectos: o fato de as abelhas da espécie *Apis mellifera* possuírem hábitos alimentares amplamente generalistas quanto ao pasto visitado (MINUSSI, ALVES-DOS-SANTOS, 2007); e a influência que essa composição exerce sobre a composição química, fitoquímica e biológica do pólen (FEAS et al., 2012).

A identificação da origem botânica das amostras de pólen baseou-se na morfologia dos grãos acetolisados. A Figura 06 apresenta os principais tipos polínicos encontrados nas amostras analisadas, permitindo observar as diferenças entre eles.

**Figura 06:** Microfotografia das lâminas produzidas a partir do sedimento polínico acetolisado em microscópio óptico em lente de aumento de 100x



A frequência dos tipos polínicos está representada na Tabela 03. A partir dela foi possível definir as informações sobre o pasto apícola utilizado pelas abelhas, apontando o tipo de vegetação de sua preferência, cabendo ressaltar que isto contribui para a preservação ou ampliação do mesmo para garantir a boa produção de pólen apícola pelo apiário.

**Tabela 03:** Espectro polínico das amostras de pólen apícola da região norte do Piauí

Família	Tipo polínico	%
Anacardiaceae	Tipo Anacardiaceae	2,28
Arecaceae	<i>Cocos nucifera</i>	5,69
Fabaceae	<i>Aeschynomene</i>	2,09
Fabaceae	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	67,74
Fabaceae	<i>Mimosa pudica</i>	0,57
Fabaceae	Tipo Fabaceae	0,38
Myrtaceae	<i>Myrcia</i>	6,26
Plantaginaceae	<i>Angelonia</i>	3,04
Poaceae	Tipo Poaceae	0,57
Rubiaceae	<i>Borreria</i>	0,95
Rubiaceae	Tipo Rubiaceae	4,55
Typhaceae	<i>Typha</i>	0,19
Urticaceae	<i>Cecropia</i>	1,90

Dentre os tipos identificados, destaca-se que o tipo polínico *M. pudica* pode corresponder a outras plantas do gênero, por exemplo: *M. sensitiva*, *M. scabrella* (árvore e ocorre com maior frequência no Sudeste, mas pode ser ornamental), *M. lewisii* etc. Os tipos polínicos “Poaceae” e *Cecropia* são anemófilos, e, em geral, contaminantes de produtos apícolas, entretanto as plantas da *Cecropia* são heliófitas, ocorrendo em matas secundárias e áreas de clareiras. Já o tipo *Typha*, é anemófilo, a coleta de sua inflorescência é feita por

abelhas-sem-ferrão e as plantas são indicadoras de áreas alagadas, pois só crescem em charcos ou bordas de lagos e lagoas.

Baseado na frequência dos tipos polínicos, o pólen apícola pode ser considerado monofloral ou heterofloral. Neste caso, considerando as afirmações de Arruda et al. (2013), quando a amostra possui mais de 45% de um mesmo táxon botânico na sua composição, o pólen pode ser considerado monofloral. Contudo, os autores destacam que além do percentual é necessário que o táxon seja um grande produtor de grãos de pólen.

Nota-se que *Mimosa caesalpinifolia* é a espécie dominante no pólen coletado, com mais de 45% de contribuição. Esta planta é uma Fabaceae subfamília Mimosaceae, conhecida popularmente como sabiá ou sansão-do-campo, uma planta nativa e das mais representativas da vegetação do Nordeste brasileiro, cujas flores apresentam alto teor de néctar e, por isso, grandes produtoras de pólen (ALVES, 2013), denotando seu alto valor apícola. De acordo com Souza (2012), seu período de floração coincide de março a abril, justificando a predominância desse tipo polínico nas amostras analisadas, visto que a coleta compreendeu este período.

Pela Tabela 03 é possível verificar que algumas espécies foram destacadas em relação às demais, isto porque elas são grandes produtoras de grãos de pólen, corroborando a atribuição de pólen apícola monofloral, uma vez que a espécie *Mimosa caesalpinifolia* está entre as assinaladas. Logo, essas amostras podem ser consideradas monoflorais. Nascimento (2015) obteve resultado semelhante pesquisando a origem botânica do pólen produzido nesta região. Isto pode ser justificado porque o principal período de produção de pólen por essa unidade constituir-se entre os meses de fevereiro a maio, nos quais o índice pluviométrico é mais significativo, favorecendo a alimentação das abelhas.

Melo et al. (2009) também identificaram amostras de pólen do interior do estado de São Paulo com predominância do tipo polínico tipo *Mimosa caesalpinifolia*, demonstrando que este tipo polínico influencia de modo inversamente proporcional a concentração de lipídeos. O impacto deste parâmetro pode ser sentido na composição de substâncias bioativas que sejam lipossolúveis ou hidrossolúveis, aumentando ou reduzindo o potencial biológico dessas amostras.

Modro, Marchini e Moreti (2011) destacam que esse tipo polínico é mais frequente nas amostras coletadas no verão, o que corrobora com os resultados obtidos por nossa pesquisa. Enfatizam ainda que nessa estação do ano há maior riqueza em recursos polínicos, tanto em quantidade como em variedade, uma vez que os índices pluviométricos, em geral,

são maiores, o que implica em maior desenvolvimento de flores, representando mais opções de pasto para as abelhas, justificando a variedade observada na Tabela 03.

A maioria dos estudos sobre a *M. caesalpinifolia* é direcionada para o aspecto de cultivo e manejo propriamente dito. Contudo, Cartaxo (2009) indica propriedades medicinais e/ou farmacológicas da planta, sendo utilizada no combate à inflamação em geral. Além disso, pesquisas apontam para o potencial antioxidante de suas inflorescências, devido à presença de quercetina, rutina entre outros, e de prevenirem genotoxicidade em testes prévios (SILVA et al., 2014; SANTOS et al., 2015). E nenhum caso de alergia foi relatado.

A literatura científica (Ribaski et al., 2003, Agra et al., 2008 e Santos et al., 2015 citados por BARBOSA, 2017) demonstra que esta espécie tem sido utilizada pela população com finalidade medicinal: a casca do caule pode ser usada tanto por via oral, para o tratamento de doenças respiratórias, quanto externo, para o tratamento de ferimentos e sangramento. Além da casca, suas inflorescências tem uso tradicional pela população no tratamento de hipertensão.

De acordo com levantamento feito por Monção et al. (2015), espécies de *Mimosa* são ricas em polifenóis como flavonoides, lignanas, alcaloides, esteroides entre outros, substâncias essas que poderiam ser responsáveis pelos efeitos de: potencial antioxidante, atividade antimicrobiana, ação anti-inflamatória, antifúngica, antinociceptiva e antiulcerogênica e efeitos citotóxicos. Eles revelaram em sua pesquisa fitoquímica e biológica da casca do caule de *M. caesalpinifolia*, que a mesma pode representar uma fonte alternativa de compostos antitumorais, associando esse efeito à presença do ácido betulínico e por sinergismo químico com outros compostos.

Essas informações são importantes para servir de suporte para a avaliação de compostos bioativos encontrados nessas amostras, uma vez que essa composição botânica reflete-se diretamente sobre a caracterização dos extratos.

### 5.1.2 Identificação de compostos bioativos do pólen apícola

O pólen apícola é relatado como uma importante fonte de substâncias bioativas tais como fitoesteróis, carotenoides e polifenóis (GABRIELE et al., 2015). Estes são quimicamente definidos como substâncias com um anel aromático unido a um ou mais grupos hidrofílicos, incluindo seus grupos funcionais que lhes confere o poder antioxidante, isto porque eles atuam como agentes redutores, doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio *singlet* (SOARES et al., 2008; NEGRI et al., 2011; LIN et al., 2016).

Por não haver um padrão metodológico de extração dos polifenóis, optou-se utilizar como referência a pesquisa de Zhang et al. (2015) que demonstraram uma condição de trabalho com resultados superiores às demais utilizadas. Assim sendo, na Tabela 04 constam os resultados obtidos na caracterização qualitativa de compostos bioativos presentes nas amostras de extrato de pólen apícola empregadas na confecção da membrana.

**Tabela 04:** Conteúdo de polifenóis, flavonoides e de atividade antioxidante do extrato de hidroetanólico de pólen apícola

<b>Amostra</b>	<b>Polifenóis*</b> (mg GAE g <sup>-1</sup> pólen)	<b>Flavonoides*</b> (mg CAE g <sup>-1</sup> pólen)	<b>DPPH</b> (EC <sub>50</sub> )	<b>ABTS*</b> (µmol de trolox g <sup>-1</sup> pólen)	<b>FRAP*</b> (µmol de trolox g <sup>-1</sup> pólen)
Extrato	19,69±0,59	4,79±1,29	40mg/ml	33,72±0,35	2,75±0,07

\*Resultados expressos em média±desvio padrão (n=3). FT – Fenólicos totais; FL – Flavonoides.

Na Tabela 04 constam os resultados verificados nesta pesquisa e dados comparativos obtidos na literatura, sendo possível observar as diferenças entre os valores registrados. Isto porque o conteúdo de compostos bioativos sofre influência de vários fatores, tais como: época de coleta, florada, solvente, forma de extração, manuseio do extrato, região geográfica de plantio, variação à exposição solar, método de cultivo e fertilização aplicados, cultivar analisado, dentre outros (FALLER, FIALHO, 2009). Essas variações tendem a ser observadas, especialmente, em polens produzidos por abelhas da espécie *Apis mellifera* por possuírem hábitos alimentares amplos (MINUSSI, ALVES-DOS-SANTOS, 2007), o que dificulta comparar tipos polínicos da mesma origem botânica.

Na literatura científica encontrou-se os resultados de LeBlanc et al. (2009), como é possível notar pela tabela, que trabalharam com espécies familiares às identificadas nesta pesquisa, contudo suas amostras eram provenientes do deserto de Sonoran, então, acredita-se que essa alta taxa de insolação tenha contribuído para essa máxima produção de compostos fenólicos. Amostras do mesmo gênero foram estudadas por Menezes et al. (2010), entretanto o modo de extração pode ter influenciado na resposta – uma vez que o solvente foi o mesmo – pois utilizaram aquecimento e agitação para a obtenção do extrato, enquanto o desta pesquisa foi extração a frio. Isso reforça o impacto das condições ambientais sobre estas análises.

Além desses interferentes, a combinação de solventes representa um ponto de relevância para uma extração eficiente de compostos fenólicos de uma matriz vegetal,

destacando o metanol e o etanol como os solventes mais indicados como meios extratores devido às suas polaridades (LIU et al., 2000). Embora o metanol apresente uma polaridade ligeiramente superior a do etanol, com poder de arraste de substâncias maior que o etanol, conseguindo tanto em termos quantitativos como qualitativos como mostrado por Azmir et al. (2013), o uso de etanol é mais usual, uma vez que o metanol pode conferir toxicidade e a possibilidade de desencadear sérios problemas à saúde humana (BARBI, 2016).

Os flavonoides apresentam características estruturais diferentes e exibem várias atividades biológicas. Como grupo predominante na classe dos polifenóis, sua atividade antioxidante se dá pela sua oxidação, causada por radicais, estabilizando-os (ALICIC et al., 2014). A atividade antioxidante é uma das mais comuns atribuídas aos polifenóis. De acordo com o modo de ação sobre os radicais livres (direta ou indireta) eles são considerados antioxidantes primários, pois reagem diretamente com radicais formando produtos termodinamicamente estáveis ou complexos mais estáveis que o radical livre precursor, interrompendo a reação radicalar (ARCHELA, DALL'ANTONIA, 2013). Essa é uma informação interessante que justificaria a variação de respostas aos testes realizados, visto a variedade de testes antioxidantes *in vitro* que podem ser aplicados aos extratos.

Esse estudo aplicou três tipos de teste para realização de uma avaliação mais ampla (Tabela 04), pois têm sido relatados comportamentos distintos de ação. Isto porque há compostos que possuem excelente propriedade de quelação do ferro e de outros metais de transição, e outros agem neutralizando a ação oxidativa dos radicais livres (FIORANI et al., 2002). Outro ponto é a variação na sensibilidade dos métodos de atividade antioxidante. A medida do DPPH foi feita por  $EC_{50}$ , que representa a concentração mínima onde ocorre a redução de 50% da concentração do radical, verificando-se a concentração de  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  que comparada aos achados aos referenciados na literatura, nota-se que a atividade esteve inferior a maioria. Segundo Gabriele et al. (2015), o teste de DPPH tem sido largamente usado na determinação da atividade de estabilização de radicais de produtos apícolas e destacam a variação dos resultados obtidos pelas pesquisas em função das diferenças entre as espécies de flores visitadas e, conseqüentemente, a composição química, bem como pelo solvente. Duarte-Almeida et al., (2006) explicam que essa avaliação baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, neste caso o DPPH. Como a atividade é dada pela perda da absorvância em 515 nm, quanto maior a perda, maior será a atividade antioxidante da amostra (CARVALHO, 2016).

Quanto ao ensaio da atividade de sequestro do radical ABTS, Carvalho (2016) explica que o ABTS sua forma radicalar possui uma coloração azul/verde com absorção máxima em 734 nm, a partir do momento em que é estabilizado, perde a coloração se tornando incolor, logo quanto maior a perda, mais ativa é a amostra. Quanto maior a concentração  $\mu\text{mol}$  de trolox.g de pólen, maior a atividade do produto em teste. Contudo, o valor encontrado pode ser considerado relativamente baixo quando comparado a outros verificados na literatura (ZHANG et. al., 2015).

O método de FRAP baseia-se na atividade redutora do íon  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , analisando a capacidade que determinada amostra tem de transferir elétrons e causar redução de íons metálicos ou radicais livres, medindo assim a sua capacidade redutora, a qual é proporcional ao ganho de absorção, quanto maior o ganho mais eficiente ela será (CARVALHO, 2016).

Ainda é pouco usual nas metodologias de avaliação da atividade antioxidante das amostras de pólen, mas o resultado deste teste pode ser considerado um pouco menor do que o encontrado por LeBlanc et al.(2009), pois a quantidade de substância necessária para promover a redução do íon  $\text{Fe}^{3+}$  é menor, sinalizando que o extrato possui baixa capacidade de transferência de elétrons. Este método representa uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em fluidos biológicos e soluções aquosas de compostos puros (PULIDO et al., 2000), uma vez que os métodos *in vitro* são radicais que não são encontrados no organismo humano.

LeBlanc et al., (2009) enfatizam as diferenças nos resultados das amostras utilizadas, destacando a planta Mimosa como uma excelente contribuinte em compostos fenólicos, uma vez que ela foi relatada como fonte de altos níveis de polifenóis e possuidora da maior atividade antioxidante comparada a outras culturas de energia renovável como: *Sericea lespedeza*, *Pueraria*, arunzu, *Panicum virgatum*, *Mucuna pruriens*.

Juntamente a essa capacidade dos polifenóis neutralizarem radicais livres, outros efeitos fisiológicos podem ser registrados, tais como: anti-inflamatório, antialérgico, antiviral, anticancer, antifúngico, quimioprotetor, imunoestimulador, hepatoprotetor e inibidor de enzimas específicas (KOSTIC et al., 2015; RZEPECKA-STOJKO et al., 2017).

Ainda que esses radicais testados não sejam encontrados nos organismos vivos, é uma medida química importante para avaliar o potencial de ação dos extratos de pólen apícola. E isto ganha um significado ainda mais relevante dentro do escopo desta pesquisa, pois a inclusão deste extrato na membrana para tratamento de lesões cutâneas pode acelerar esse processo de cura, uma vez que, como afirmam Carvalho e Coutinho Neto (2016), as espécies

reativas de oxigênio produzidas pelo próprio organismo podem desestruturar as membranas, prejudicando seu funcionamento e impedindo o metabolismo celular.

Os resultados obtidos na identificação via CLAE-DAD/EM-ESI estão relacionados na Tabela 05. A identificação dos compostos só foi possível a partir da comparação dos fragmentos gerados na espectroscopia de massa dos picos de maior intensidade com os existentes na literatura.

**Tabela 05:** Compostos fenólicos identificados no extrato etanólico de pólen apícola da região norte do Piauí por CLAE-DAD/EM-ESI (tempo de retenção, *m/z*)

	T <sub>r</sub>	MS	ID
1	1,4	305	Epigallocatequina ou galatocatequina
2	1,5	191	Ácido quínico
3	1,6	195	Ácido galactônico
4	5,2	335	Ácido cafeoilchiquimico
5	8,8	353	Ácido clorogênico (isômero)
6	9,1	273	Floretina
7	11,7	625	Quercetina-3-O-glicosídeo
8	11,8	625	Quercetina 3,7-di-O-hexosídeo
9	12,8	436	Floretina hexosídeo
10	13,2	609	Quercetina rutinosídeo (isômero)
11	13,4	194	Ácido ferúlico
12	13,4	195	Ácido galactônico
13	13,4	609	Luteolina-6,8-di-C-glicosídeo
14	13,6	639	Isoramnetina-3-O-diglicosídeo
15	14,0	623	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo (isômero)
16	14,3	463	Quercetina-3-O-glicosídeo
17	14,3	593	Luteolina-4-O-ramnosídeo(1-2)glicosídeo
18	14,9	623	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo (isômero)
19	15,0	593	Caempferol-3-O-glucosídeo-7-ramnosídeo
20	15,4	447	Luteolina-7-O-glicosídeo
21	15,5	477	isoramnetina-3-O-glucosídeo
22	15,8	563	Derivado de ramnetina-3-O-(6-O-acetilglucosídeo)

23	16,0	533	Caempferol-3-O-malonilglucosideo
24	16,0	489	Caempferol-3-O-acetilglucosideo
25	18,8	327	Ácido oxo-dihidroxi-octadecenoico (isômero)
26	19,3	580	Naringina

Nota-se a presença tanto de ácidos fenólicos quanto de flavonoides no extrato analisado, sendo estes últimos o grupo mais abundante em alimentos. Não foi verificada nesta pesquisa a presença de ácido gálico, o qual foi utilizado como padrão para a composição de fenólicos totais pelo método de *Folin-ciocalteu*, o que poderia justificar a concentração inferior aos dados de LeBlanc et al. (2009) que utilizou o mesmo tipo polínico. O mesmo procede para a análise colorimétrica de flavonoides totais, uma vez que não foi encontrada rotina entre as substâncias constituintes do extrato utilizado.

Quanto aos ácidos fenólicos, o ácido quínico demonstra atividades radioprotetoras, antidiabéticas, antineuroinflamatórias e efeitos antioxidantes (JANG et al., 2017). A seus inúmeros derivados tem sido registrado como efeitos benéficos função antiviral, efeito hipoglicemiante e hepatoprotetor (FARAH, DANGELO, 2006). Foi apontado como um regulador crucial da inflamação na lesão aterosclerótica precoce (ARYA et al., 2014). Este composto só foi detectado em pólen floral de ambrosia, uma planta típica da América do Norte e presente na Europa. Nesta amostra também foi encontrado o ácido clorogênico, um derivado do ácido quínico, que além das propriedades supracitadas, a literatura revela sua ação anti-obesidade, efeito anti-hipertensivo, efeitos antitumorais e citotoxicidade em tumores orais e efeitos antimutagênicos e anti-inflamatórios (KRAUJALYTE et al., 2013).

O ácido cafeoilquímico foi registrado como um dos fatores de resistência das raízes de palma em relação à *Fusarium oxysporum* e como responsável por mais da metade do conteúdo fenólico total do óleo de palma, o qual apresenta elevada atividade antioxidante (SAMBANTHAMURTHI et al., 2011). O ácido ferúlico é o ácido fenólico mais abundante encontrado nas plantas, inclusive já foi detectado em amostras de pólen apícola, possui atividade antitrombótica (OU, KWOK, 2004) como diferencial em relação aos outros compostos.

O ácido galactônico ou glucônico é um ácido orgânico, considerado não fenólico muito comum em méis de várias origens botânicas e que contribui para a capacidade antioxidante verificada nesses produtos, uma vez que eles podem quelar metais e pode

umentar sinergicamente a ação de outros antioxidantes, como os fenólicos (GHELDOF et al., 2002). Nenhuma referência com pólen apícola foi encontrada.

O extrato analisado possui uma variedade considerável de flavonoides. Estes são subdivididos em seis grupos, conforme o arranjo da estrutura e as substituições do anel C: flavonóis (catequinas) e antocianidinas se o anel for um pirano heterocíclico; ou flavonóis (caempferol e quercetina), flavonas (luteolinas e apigeninas), isoflavonas (daidzeina; gliciteína; genisteína) e flavanonas (taxifolina; naringenina) se o anel for uma pirona (HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). Dos compostos identificados nesta pesquisa, duas atividades biológicas comuns são atividade antioxidante e anti-inflamatória.

Como a identificação ocorreu em função dos fragmentos gerados, o primeiro composto detectado na amostra ficou indefinido se correspondia à epigallocatequina ou à galocatequina, pois os principais fragmentos foram coincidentes. O primeiro composto é conhecido por inibir a síntese do DNA em *Proteus vulgaris* (proteus), uma vez que as catequinas, de um modo geral, demonstram atividade antimicrobiana. (KUMAR, PANDEY, 2013). Já a galocatequina inibe a peroxidação lipídica da fosfatidilcolina (PLUMB et al., 2013), o qual é o principal fosfolipídio que compõe a membrana celular dos mamíferos e está envolvido na sinalização, crescimento proliferativo e nos processos de morte celular (CUI, HOUWELING, 2002; RIDGWAY, 2013). Ambas as substâncias são encontradas com frequência e em maior quantidade em chá verde (COLON, NERIN, 2012) e nenhum dos dois havia sido notificado em pólen apícola.

A quercetina, facilmente encontradas em pólen apícola de diversas origens botânicas (TRUCHADO, FERRERES, TOMAS-BARBEAN, 2009; MIHAJLOVIC et al., 2015; MOHDALY et al., 2015, DE-MELO et al., 2018), apresenta como funções adicionais a ação anti-hipertensiva, efeito vasodilatador, antiobesidade, anti-hipercolesterolêmico e antiaterosclerótico (DAVID, ARULMOLI, PARASURAMAN, 2016). Sua presença na natureza é bastante comum em formas glicosiladas, o que corrobora com as três formas encontradas na amostra: quercetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3,7-di-O-hexosídeo e quercetina rutinosídeo.

Observa-se que foram encontrados três tipos de caempferol glicosilado nesta pesquisa: caempferol-3-O-glucosídeo-7-ramnosídeo, caempferol-3-O-malonilglucosídeo e caempferol-3-O-acetilglucosídeo. Isto porque este composto está disponível na natureza principalmente na sua forma glicosilada, assim como a quercetina, e responde pelas funções adicionais de

proteção cardiovascular, antidiabético, hepatoprotetor, neuroprotetor e preventivo contra câncer (WANG et al., 2018).

A isoramnetina é um composto bioativo presente em plantas medicinais com amplas funções biológicas, tais como: inibir a ativação da via apoptótica induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por captura de espécies reativas de oxigênio livres; protege contra quadros de cardiopatias e contra injúrias endoteliais causadas por lipoproteína de baixa densidade oxidada (LUO et al., 2015). Neste experimento foram encontradas a isoramnetina-3-O-diglicosídeo, isoramnetina-3-O-rutinosídeo e derivado de ramnetina-3-O-(6-O-acetilglucosídeo).

A luteolina é um dos flavonoides mais comuns em alimentos e mais usados pela medicina tradicional. Isto porque além das ações supracitadas foram comprovados efeitos quimioprotetores e quimiopreventivos, ação antimicrobiana (contra microrganismos fitopatogênicos), neuroprotetor e antialérgico (LOPEZ-LAZARO, 2009; ALI et al., 2019). Substâncias encontradas nesta pesquisa foram: luteolina-6,8-di-C-glicosídeo; luteolina-4-O-ramnosídeo(1-2)glicosídeo; luteolina-7-O-glicosídeo.

A naringina é uma flavanona glicosilada naturalmente. Encontrada especialmente em frutas cítricas, que possui atividades antiapoptóticas, previne contra o dano oxidativo promovendo a síntese da glutatona (GSH) e diminui o nível de malondialdeído (MDA), melhora os efeitos do diabetes e de suas complicações (PEREIRA et al., 2007; ZHANG et al., 2017). Sua ocorrência em amostras de pólen de outras origens botânicas já foi relatada. Essas atividades são bem similares às descritas para fletina e seus glicosídeos (ZHANG et al., 2016).

Percebe-se que a maioria dos flavonoides aparece ligada a glicosídeo, isto porque é como eles estão comumente disponíveis na natureza (HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). É possível que a presença desses glicosídeos possa ter interferido na reação de determinação da capacidade antioxidante pelos métodos empregados nesta pesquisa, diminuindo sua reatividade, pois são métodos *in vitro* e com radicais que não são fisiológicos. Contudo, no organismo esses glicosídeos seriam importantes para a absorção desses compostos, permitindo que eles cheguem ao sítio celular e promovam suas ações (HUBER, RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Em relação ao tipo polínico dominante, estudos prévios indicam a presença marcante de taninos, especialmente nas folhas, em função das intempéries próprias da região Nordeste (GUIMARAES-BEELEN et al., 2006; BRITO et al., 2017). Outros trabalhos com cascas e raízes da mesma planta (NASCIMENTO et al., 2012; SILVA et al., 2014b; MONÇÃO et al.,

2015) mostraram a presença de outros compostos, dos quais apenas o ácido ferúlico derivados de quercetina foram iguais aos encontrados nesta pesquisa.

Essas divergências podem ser creditadas ao fato de o pólen ser coletado das inflorescências das plantas, parte essa que não foi encontrado estudo de identificação de compostos fenólicos. Por isso esta avaliação é tão importante, pois é a composição polínica quem responde pelas características apresentadas por determinada amostra de pólen, justificando os efeitos demonstrados por produtos que o contenham.

### 5.1.3 Atividade antimicrobiana

Os microrganismos foram escolhidos em função da sua importância em infecções hospitalares, por estarem frequentemente na pele humana. Esta quando íntegra protege o organismo da ação patogênicas desses seres, porém quando injuriada fornece os elementos fundamentais para a multiplicação dos mesmos, ou seja, água, nutrientes e pH conforme a sua tolerância. Os resultados estão representados na Tabela 06.

**Tabela 06:** Atividade antimicrobiana dos extratos de pólen apícola contra as espécies testadas por Concentração Inibitória Mínima – CIM

Microrganismos	Concentração do extrato (mg/mL)				
	0,67	1	1,5	2 a 75	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+
Pool	+	+	+	+	+

+ crescimento visível; - ausência de crescimento.

Os resultados obtidos nesta pesquisa foram similares aos encontrados por Carpes et al. (2009), destoando de alguns estudos prévios (FATCOVA-SRAMKOVA et al., 2014; PASCOAL et al., 2014; MOHDALY et al., 2015), uma vez que o material analisado não mostrou atividade contra os microrganismos selecionados, exceto para *Pseudomonas aeruginosa* que à concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> não apresentou crescimento visível, o que é

bastante positivo, considerando que esta bactéria gram-negativa oportunista é responsável por grande parte das infecções hospitalares, especialmente em pacientes imunocomprometidos, sujeitos a transplantes, intervenções cirúrgicas, entre outros. Além de apresentar uma resistência inata a vários antimicrobianos e antissépticos (REIS, 2011).

Carpes (2008) ressalta que esta capacidade está relacionada tanto com a inativação de enzimas celulares quanto com mudanças na permeabilidade da membrana celular dos microrganismos. E atribui à composição botânica a responsabilidade pelas diferenças de resultados entre os estudos que serviram de comparação, uma vez que a composição química está intrinsecamente relacionada à origem floral, ao solo e condições climáticas.

## **5.2 Estudos *in vivo***

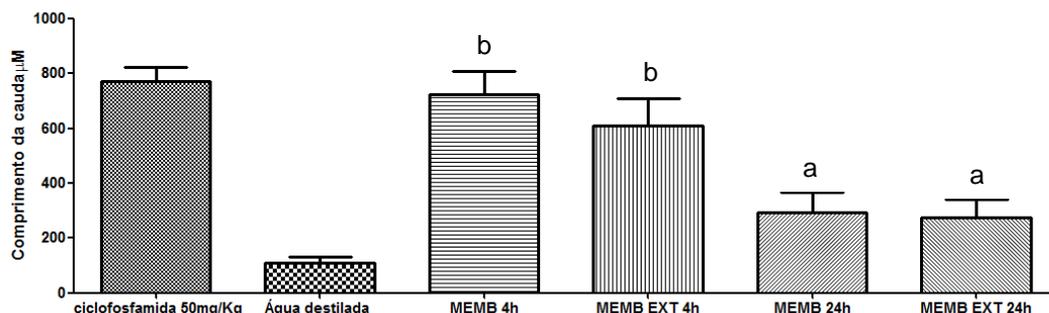
Plantas biossintetizam uma grande variedade de fitoquímicos benéficos para a saúde humana, entre eles compostos que possuem propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas. Entretanto, elas também podem produzir compostos tóxicos, mutagênicos e / ou carcinogênicos naturais, sendo que apenas uma pequena parte das espécies existentes no reino vegetal foi avaliada por suas atividades biológicas e propriedades genotóxicas, enquanto a crescente demanda por produtos naturais derivados de plantas em cosméticos, medicina e indústria de alimentos requer uma avaliação mais sistemática e abrangente dos seus benefícios e possíveis efeitos adversos, como genotoxicidade (PUKALSKIENĖ et al., 2018).

O teste de micronúcleo identifica um pequeno grupo de quebras de fita de DNA não reparadas, enquanto o ensaio do cometa alcalino identifica quebras de fita e locais sujeitos a serem removidos posteriormente pelo sistema de reparo de DNA. Assim, pode-se dizer que esses métodos se complementam e ambos são amplamente usados para quantificar danos no DNA, sendo considerados como padrão-ouro (HEUSER et al., 2008). O uso desses testes permite também avaliar a genotoxicidade sistêmica ou *in situ*, uma vez que os dois ensaios podem ser empregados em tecidos ou células específicos. (ARALDI et al., 2015).

### **5.2.1 Teste cometa alcalino**

O ensaio cometa é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para avaliar danos no DNA. Isto pode ser motivado pelo fato da técnica ser de alta sensibilidade, requerer pequeno número de células, baixo custo e facilidade de aplicação. O ensaio de cometa alcalino detecta uma mistura de lesões de DNA, incluindo quebras de cadeia simples e dupla, e locais lábeis a álcalis (COLLINS et al., 2008). A Figura 07 demonstra de modo gráfico os resultados obtidos quanto ao comprimento da cauda do DNA formada a partir do dano.

**Figura 07:** Avaliação do dano/reparo pelo comprimento da cauda de DNA formada

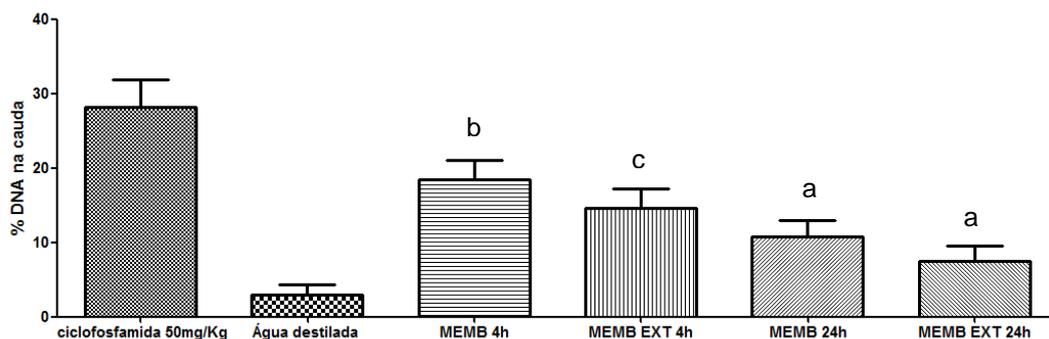


a – diferença significativa em relação ao controle positivo; b – diferença significativa em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Após 4h da implantação tanto da membrana sem extrato quanto com extrato observa-se aumento dos danos genéticos em relação ao comprimento da cauda, o qual não mostrou diferença significativa do controle positivo. Após 24h este aumento foi estatisticamente diferente da primeira avaliação, não mostrando diferença significativa em relação ao controle negativo, para ambas as membranas.

A Figura 08 demonstra os resultados obtidos para o parâmetro percentual de DNA na cauda.

**Figura 08:** Avaliação do dano/reparo pelo percentual de DNA na cauda do cometa



a – diferença significativa em relação ao controle positivo; b – diferença significativa em relação ao controle negativo; c – diferença significativa em relação a ambos os controles ( $p < 0,05$ ).

É possível verificar pela análise da Figura 06 que houve diferença estatística entre a o controle negativo e as duas formas de apresentação estudada (membrana com e sem extrato), bem como houve diferença significativa entre a membrana com extrato do controle positivo. Contudo, transcorridas 24 h do implante, notou-se um reparo significativo do DNA, uma vez que não houve diferença significativa do percentual de DNA tanto para a membrana com extrato e sem extrato em comparação ao grupo controle negativo. Portanto, pode-se afirmar

que os resultados do comenta indicam reparação do DNA após 24 horas da implantação do material, notada tanto no comprimento da cauda quanto no percentual de DNA na cauda. Isto sinaliza para a possibilidade de uso do material desenvolvido, uma vez que o mesmo não prosseguiu promovendo danos ao longo do experimento. Pascoal et al. (2014) apontam os flavonoides como preventivos de mutações, pois os mesmos são capazes de inativar eletrófilos, eliminar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, elementos importantes na alteração do DNA. Ainda, Denisow e Denisow-Pietrzyk (2016) destacam que as atividades anticarcinogênicas associadas ao pólen apícola podem ser derivadas de suas propriedades antioxidantes, tais como supressão da formação das espécies reativas de oxigênio e remoção ou inativação destas, bem como a habilidade do pólen induzir à apoptose e estimular a secreção de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).

### 5.2.2 Teste de micronúcleo

Micronúcleo (MN) corresponde a uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. Ele se forma no processo de divisão celular (mitose), quando fragmentos cromossômicos acêntricos ou inteiros não são englobados pelo envelope nuclear, sendo excluídos do núcleo principal das células filhas. Assim, a detecção de micronúcleos indica perda de cromatina devido a dano cromossômico estrutural ou no aparelho mitótico. Cabe ressaltar que a expressão dano no DNA decorrente da exposição a agentes mutagênicos em MN só é segura após um ciclo de divisão celular (CHEQUER, 2008).

Os resultados do teste de micronúcleo estão apresentados na tabela 07. O agente indutor de alterações escolhido como parâmetro positivo foi a ciclofosfamida, um quimioterápico anticancer comumente utilizado no tratamento de tumores malignos (TAMAYO-CHUC, GARZA-GONZALEZ, 2015; TELES et al., 2017).

**Tabela 07:** Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em medula óssea de *Rattus norvegicus* expostos à membrana de pólen apícola

Tratamento	Nº PCEs analisados	PCEMNs		Média $\pm$ desvio padrão
		Nº	%	
Ciclofosfamida	10.000	226	0,0226	45,20 $\pm$ 8,258 <sup>a</sup>
Água destilada	10.000	61	0,0061	12,20 $\pm$ 1,924 <sup>b</sup>
Membrana com extrato	10.000	74	0,0074	12,33 $\pm$ 1,751 <sup>b</sup>

Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=6). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao nível de 5% (p<0,05).

Como a diferença entre as duas versões da membrana consistia apenas na presença do extrato, optou-se por trabalhar com a membrana com extrato com o intuito de uma racionalizar o uso de animais de experimentação. Pelos dados apresentados observa-se que os animais que receberam o implante da membrana exibiram diferença significativa do controle positivo e não houve diferença significativa do controle negativo, indicando que o material não induz a alterações cromossômicas.

Cabe ressaltar que o estudo dos micronúcleos consiste na avaliação de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, por isso é considerado como um teste primário em genética toxicológica, tendo como principais vantagens a simplicidade e rapidez. Seu número e tamanho dependem do grau e do tipo de alteração cromossômica que os originaram (AGOSTINI, 1993). A existência de números aumentados de micronúcleos é evidência de indução prévia de danos cromossômicos estruturais ou de mudanças no número de cromossomos (RODEIRO et al., 2006). O teste requer um controle negativo e um positivo, dentre as opções está a ciclofosfamida (ARALDI et al., 2015).

A ciclofosfamida é um agente quimioterápico anticancer e imunossupressor (CARVALHO, 2016), sendo o padrão para controle positivo por sua capacidade de causar alterações celulares. Após sofrer uma bioativação pelo citocromo P450 associado ao sistema oxidase funcional, a ciclofosfamida gera dois metabólitos tóxicos, a acroleína e mostarda de fosforamida, as quais são responsáveis pela indução de estresse oxidativo (EL-NAGGAR et al., 2015).

Os resultados desta pesquisa demonstram que o material testado não é genotóxico. Acredita-se que o potencial antioxidante do pólen, resultante do conteúdo de polifenóis, pode ter promovido efeito positivo em relação à quantidade de micronúcleos verificados, uma vez que o estresse oxidativo pode estar envolvido na formação dos mesmos, de acordo com Araldi et al. (2015).

Esta é a primeira vez que o pólen apícola é testado direta e separadamente em teste de genotoxicidade e mutagenicidade *in vivo*. El-Filky et al. (2013) e Fahmy et al., (2015) testaram uma mistura de produtos apícolas (mel puro, geleia real e grãos de pólen) associados à ciclofosfamida para verificar sua ação quimiopreventiva afim de minimizar os efeitos genotóxicos da droga, mas preservando sua eficácia quimioterápica. Ambos os estudos demonstraram diminuição dos efeitos colaterais deletérios do medicamento sem prejudicar sua eficácia farmacológica da droga.

A geleia real também foi testada com fins de minimização dos efeitos colaterais tóxicos do ácido valproico, usado no tratamento da epilepsia. Igualmente, foi testada associada com a droga e houve minimização dos efeitos genotóxicos em ratos, sendo este efeito relacionado com prevenção de processos oxidativos, levando em consideração os resultados no teste de MDA (GALALY et al., 2014).

Pinto et al. (2010) avaliaram o potencial genotóxico de extratos de pólen apícola das espécies *C. incanus* e *S. alba* junto a um controle positivo (bleomicina), em teste *in vitro* de cultura de células, e ambas as espécies não induziram qualquer variação significativa na frequência espontânea de MN. Os polifenóis foram apontados como os possíveis responsáveis, pois poderiam eliminar produtos químicos ativos ou enzimas responsáveis pela ativação de agentes mutagênicos, logo tanto o conteúdo total como a variação em sua composição, poderiam explicar os efeitos antimutagênicos observados.

Estes resultados representam um avanço no levantamento de informações comprovadas a respeito da segurança de uso do pólen apícola, pois as plantas originárias podem conter tanto compostos com propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas, como também podem produzir compostos tóxicos, mutagênicos e / ou carcinogênicos naturais (PUKALSKIENĖ et al., 2018).

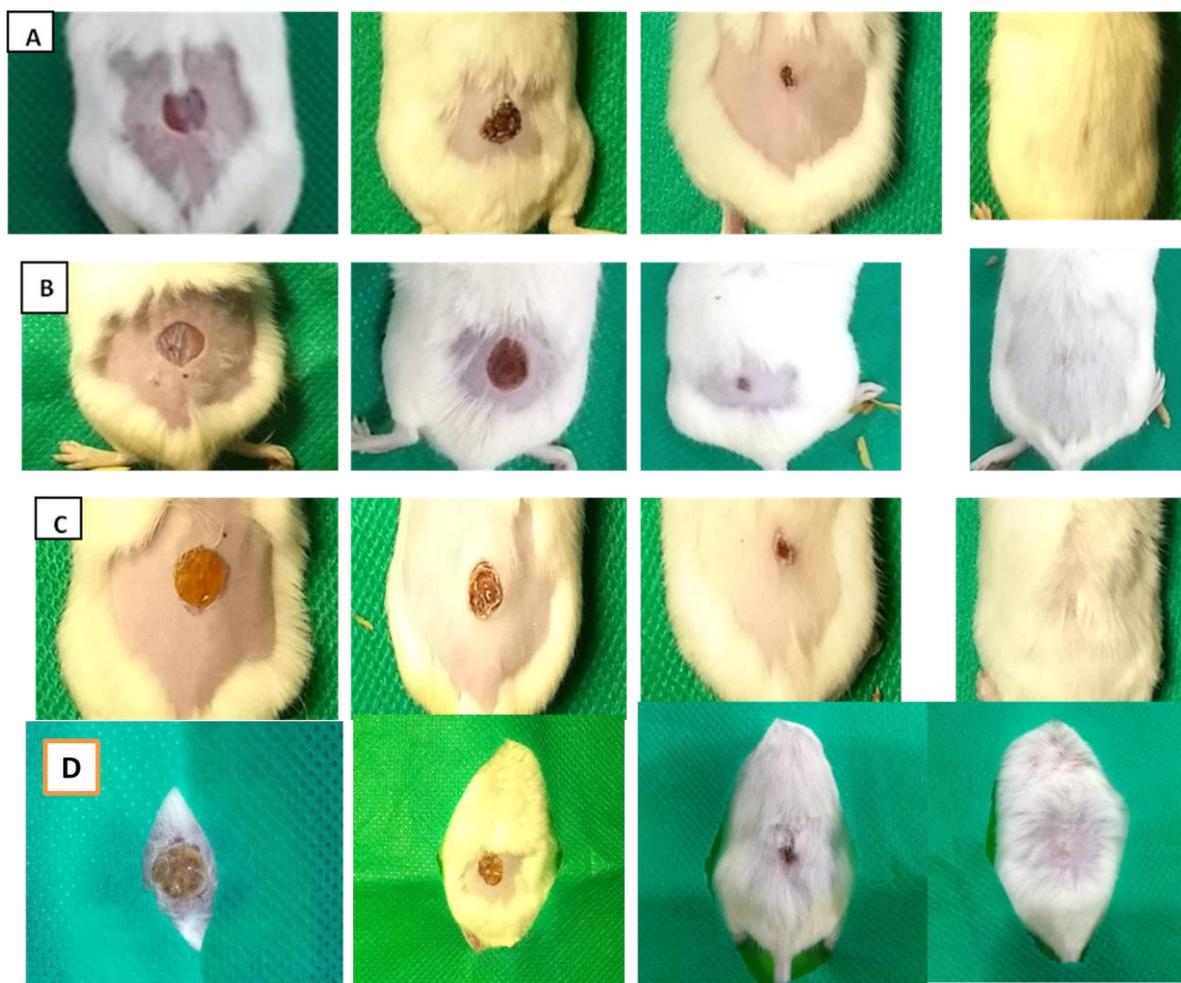
### 5.2.3 Ensaio biológico de cicatrização

A descontinuidade da pele pode ser induzida tanto por trauma quanto por procedimentos cirúrgicos. Em função disso, mudanças no tecido podem ser causadas por substâncias endógenas que estão envolvidas no processo inflamatório agudo. Esse processo é caracterizado por estimulação, migração e proliferação de células do estroma, síntese de matriz extracelular, resultando na remodelação do tecido (MELO et. al., 2011).

O emprego sistemático dos biomateriais como curativos, inicialmente focava-se na obtenção de materiais biocompatíveis que pudessem substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente e, posteriormente, buscou-se um biomaterial que promovesse a regeneração do tecido funcional de fato, considerando o aspecto biológico (SAMPAIO, CARVALHO, CARNEIRO, 2018).

É nesse contexto que a membrana à base de pólen surge como uma opção para tratamento de feridas de segunda intenção. A Figura 09 exhibe a contração das feridas produzidas intencionalmente nos camundongos ao longo do tempo de observação, ou seja, nos períodos 0, 7, 14 e 21 dias.

**Figura 09:** Aspecto macroscópico da contração da ferida dos camundongos para os períodos de 7, 14 e 21 dias após a lesão

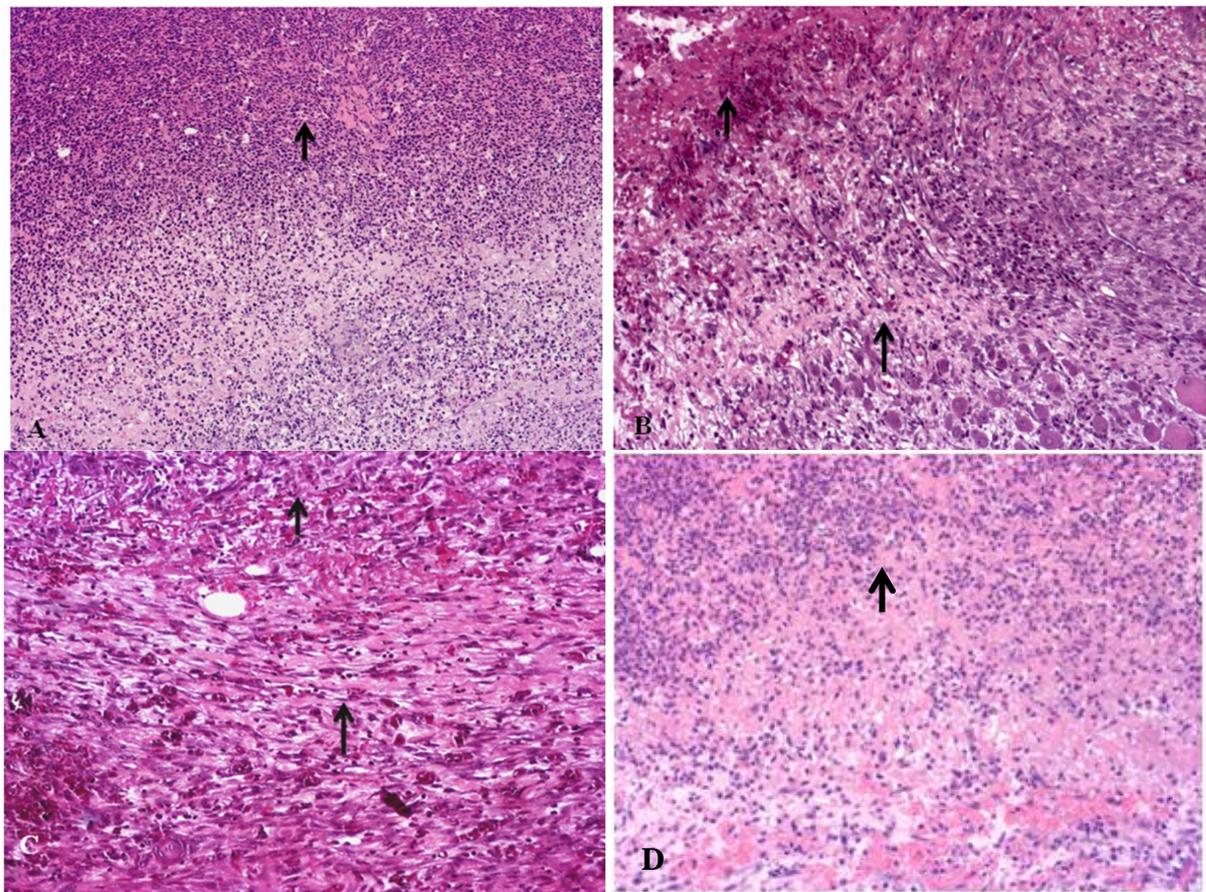


A – Grupo controle – CTRL; B – grupo pomada – CP; C – grupo da membrana com extrato – GMP; D – grupo membrana sem extrato – CMSP.

O material implantado manteve-se afixado sobre a ferida ao longo de todo o período de cura, já indicando uma possível absorção do mesmo pelo organismo. Visualmente, percebe-se que aos 21 dias, os quatro grupos mostraram a cura da área lesionada. Contudo, as análises histológicas mostraram diferenças quanto à qualidade do referido processo em todos os grupos.

As Figuras abaixo (10-18) são imagens da área do leito da ferida nos períodos de observação coradas com diferentes corantes.

**Figura 10:** Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE, 7 dias após a lesão (400x)



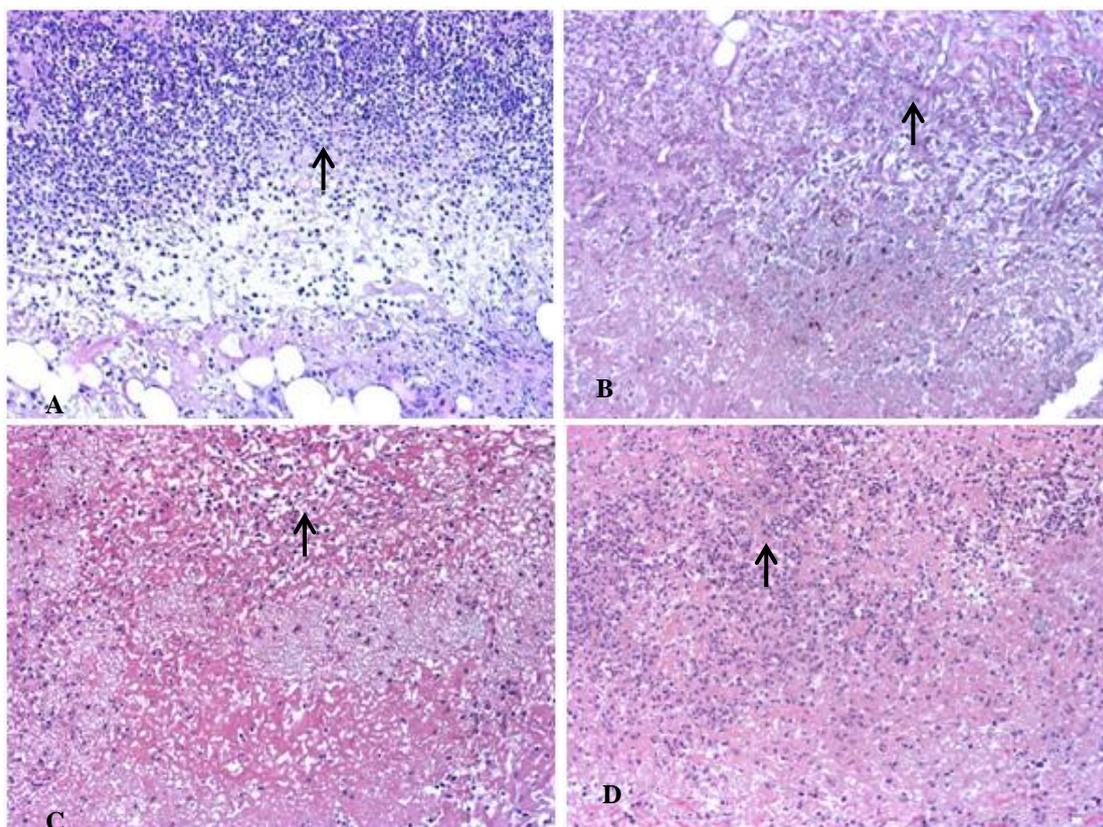
Grupo CTR: elevado número de neutrófilos e piócitos condensados na faixa mais superficial da ferida (seta menor); ausência de tecido de granulação bem definido (A). Grupo CP: material fibrinoide na superfície (seta menor); tecido de granulação (seta maior) com MEC edemaciada, capilares neoformados, macrófagos, linfócitos e neutrófilos (B). Grupo CMP: material fibrino-hemorrágico superficial (seta menor); tecido de granulação com numerosos fibroblastos volumosos, alinhados em paralelo à superfície da ferida (seta maior). Grupo CMSP: neutrófilos e piócitos condensados na faixa mais superficial da ferida (seta); ausência de tecido de granulação (D).

O estudo histológico demonstrou que, nos quatro grupos, o reparo da lesão seguiu as fases classicamente descritas, mas com algumas diferenças significativas entre os grupos. Como o processo de cura ocorre de forma centrípeta, para efeitos comparativos a documentação fotográfica limitou-se à linha média das lesões.

Em todos os grupos a superfície cruenta estava recoberta por crosta de espessura variável, composta por material fibrino-hemorrágico e restos necróticos. A epiderme marginal apresentou hiperplasia mais ou menos intensa. No leito da ferida do grupo CTR (ferida aberta – sem cobertura), notou-se elevado número de neutrófilos e piócitos sobre a ferida e ocupando toda a espessura da derme, não se observando tecido de granulação bem definido (Fig. 10A),

fato ocorrido de forma semelhante no grupo CMSP (ferida aberta com cobertura de membrana sem extrato de pólen), demonstrando elementos inflamatórios e sem tecido de granulação (Fig. 10D). No grupo CP (ferida aberta com cobertura de pomada cicatrizante comercial), os neutrófilos apareceram em menor número e distribuídos em um tecido de granulação com matriz extracelular (MEC) edemaciada, contendo capilares neoformados e células inflamatórias mononucleadas, como macrófagos e linfócitos (Fig. 10B). Enquanto no grupo CMP (ferida aberta com cobertura de membrana de colágeno com pólen apícola), o número de neutrófilos foi muito menor, notando-se tecido de granulação com células inflamatórias e fibroblastos volumosos, alinhados em paralelo à superfície da ferida (Fig. 10C). Essa presença reduzida dos elementos inflamatórios neste grupo pode ser devida à presença de substâncias anti-inflamatórias que constituíam o extrato de pólen apícola.

**Figura 11:** Fotomicrografias das secções histológicas coradas em picrossírius 7 dias após a lesão (400x)



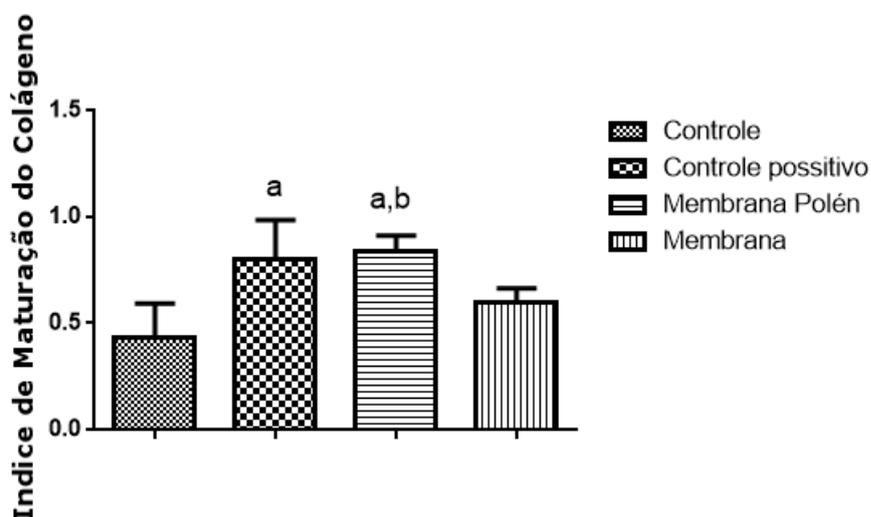
A: grupo CTRL; B: grupo CP; C: grupo CMP; D: grupo CMSP.

A Figura 11 mostra as imagens da coloração de picrossirius que traz o colágeno presente nos cortes histológicos. A avaliação da mesma leva a inferir que em nenhum dos grupos testados a área central da ferida mostrou reepitelização. Havia grande número de células inflamatórias (indicado pelas setas) sobre uma matriz extracelular frouxa contendo

material fibrinoso, não se observando deposição de colágeno. Esses dados corroboram as informações obtidas com HE. E destaca-se o grupo GMP, que apresenta menor quantidade de elementos inflamatórios que todos os outros grupos, o que sugere a ação das substâncias anti-inflamatórias e antioxidantes presentes no extrato.

A partir das imagens obtidas com o picosirius foi possível fazer o tratamento estatístico para acompanhar o índice de maturação do colágeno presente no leito da ferida, uma vez que isso é o indicativo da evolução da cicatrização, pois o colágeno tipo I presente é destruído e colágeno tipo III passa a ser sintetizado em seu lugar. Este, posteriormente, é degradado e substituído por colágeno tipo I, novamente.

**Figura 12:** Índice de maturação do colágeno 7 dias após a lesão



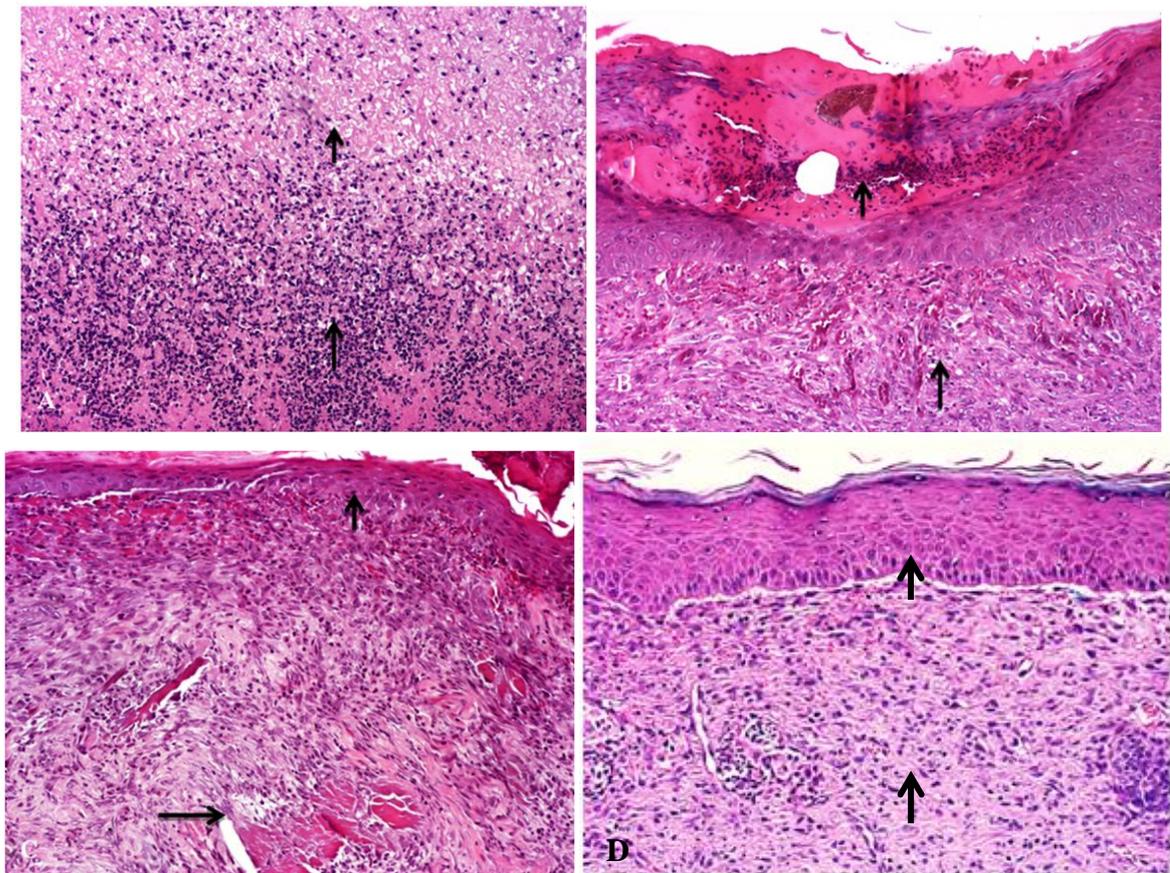
a =  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; b =  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo Membrana

Na Figura 12, verifica-se que tanto o grupo que recebeu a pomada comercial (controle positivo) como o que recebeu a membrana com extrato de pólen apícola (membrana pólen) apresentaram índices de maturação de colágeno superiores aos grupos que ficaram sem cobertura (controle) e ao que recebeu o implante da membrana pura (membrana). E foram semelhantes entre si. Cabe ressaltar que as membranas são com base em colágeno diferindo apenas na inclusão do extrato de pólen apícola. Desta forma, o resultado indica a eficiência do extrato de pólen, nesta etapa inicial, uma vez que o grupo da membrana sem extrato exibiu comportamento semelhante ao grupo que não recebeu tratamento.

Os resultados de HE indicaram a presença de um tecido de granulação formado no grupo CMP, enquanto nos demais ainda estava em estágio inicial, especialmente o grupo CTR. Pode-se dizer que estes dados são corroborados pelo índice de maturação, uma vez que

o colágeno tipo III (ou reticulina) parece ter importância crucial na orientação da migração endotelial durante os estágios iniciais da reação de granulação (RAMOS, MIRANDA, 2007), ou seja, quanto menor o índice de maturação do colágeno, maior a concentração de colágeno tipo III, que é o mais flexível.

**Figura 13:** Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE, 14 dias após a lesão (400x)

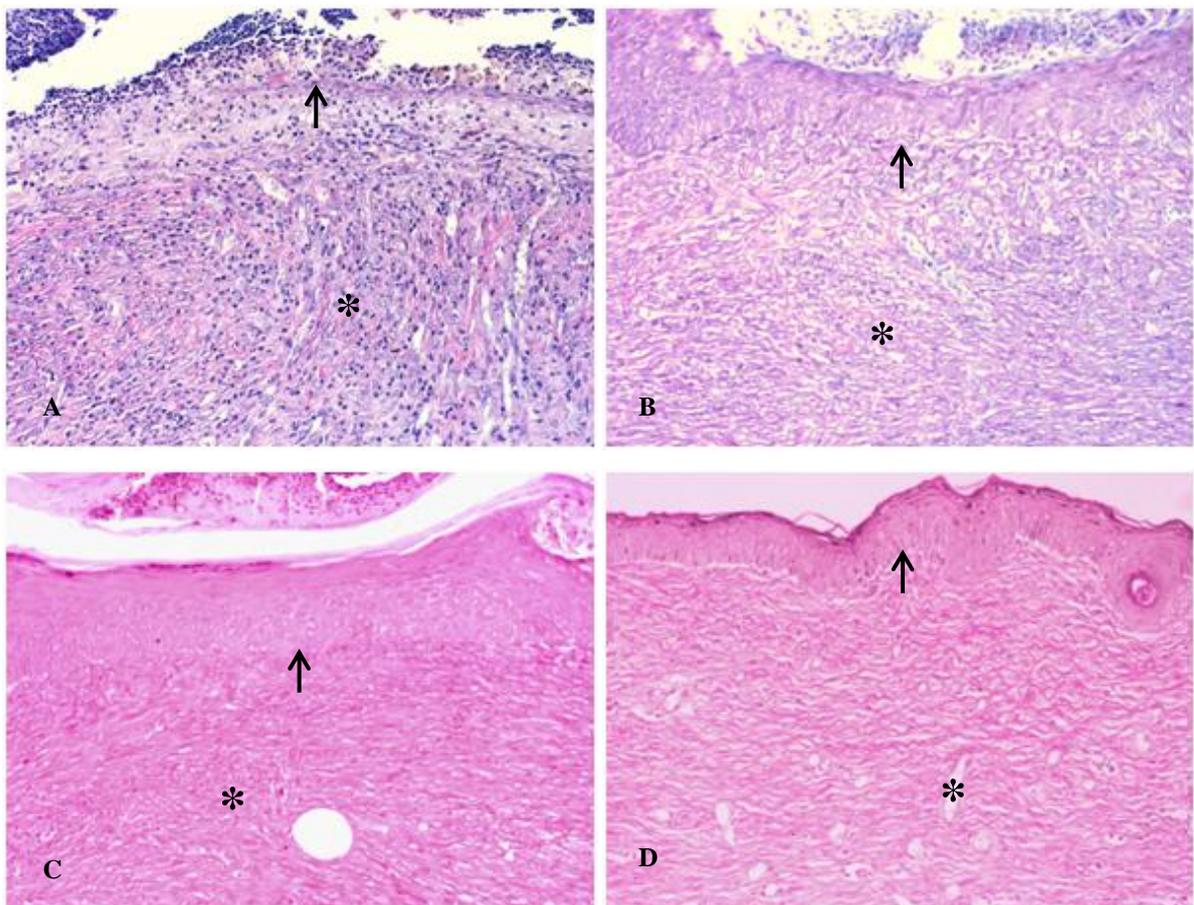


Grupo CTR: sem reepitelização na área central; material fibrinoide (seta menor) e grande número de neutrófilos e macrófagos (seta maior) (A). Grupo CP: material seroso contendo células inflamatórias sobre epiderme imatura (seta menor); MEC compacta (seta maior), com de fibroblastos jovens dispostos em diferentes orientações (B). Grupo CMP: epiderme delgada, porém madura (seta menor), com as camadas granulosa e córnea já presentes. Na derme, granulomas tipo corpo estranho em torno de material amorfo (seta maior). (C). Grupo CMSP (400x)

Nesta fase, o grupo CTR mostrou que a ferida ainda não estava epitelizada na área central, sendo seu leito ocupado por material fibrinoide e grande número de neutrófilos e macrófagos (Fig. 13A). No grupo CP, observou-se que a ferida já estava recoberta por epiderme neoformada, porém imatura, sem as camadas granulosa e córnea; sobre a epiderme neoformada havia material seroso contendo neutrófilos e macrófagos. A derme exibiu MEC mais compacta, com grande número de fibroblastos dispostos em diferentes orientações (Fig.

13B). O grupo CMP também revelou reepitelização, com epiderme delgada, porém madura, com as camadas granula e córnea já presentes. Na derme, além de tecido de granulação bem organizado, foram encontrados granulomas tipo corpo estranho em torno de material amorfo (Fig. 13C). O grupo CMSP apresentou reepitelização, com tecido de granulação e vasos neoformados na derme, porém com alguns elementos inflamatórios ainda presentes, não tendo sido observado a presença de corpo estranho como no grupo CMP (Fig. 14D). Com esses dados reforça-se a participação do extrato no processo de conforto e celeridade na cicatrização, uma vez que a presença de elementos inflamatórios remete a permanência na fase inflamatória e, em alguns casos, quadros de dor ou infecção para o paciente.

**Figura 14:** Fotomicrografias das secções histológicas coradas em picrossírius em 14 dias após a lesão (100x)

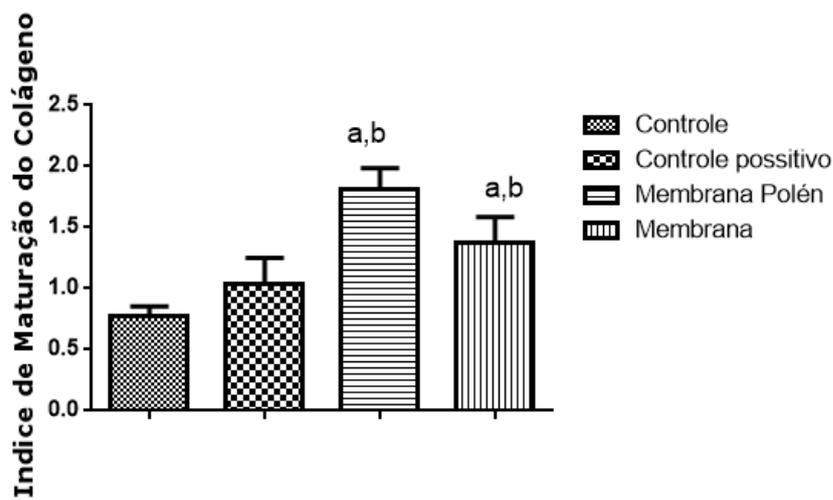


A: grupo CTRL; B: grupo CP; C: grupo CMP; D: grupo CMSP.

Pela Figura 14, nota-se que no grupo CTR (Fig. 14A), a reepitelização da ferida não está completa, com a presença de exsudato superficial de células inflamatórias (indicado por seta) e que o tecido de granulação na derme exibe deposição discreta de colágeno (indicado por \*), conforme constatado também em HE. No Grupo CP (Fig. 14B), a epiderme está refeita

(indicada pela seta), sendo recoberta por células inflamatórias e na derme, o tecido de granulação mostra deposição moderada de colágeno (indicado por \*). Nos Grupos CMP (Fig. 14C) e CMSP (Fig. 14D), a epiderme neoformada recobre a ferida; na derme, presença de numerosas fibras colágenas dispostas em feixes paralelos à superfície cutânea (indicada por\*).

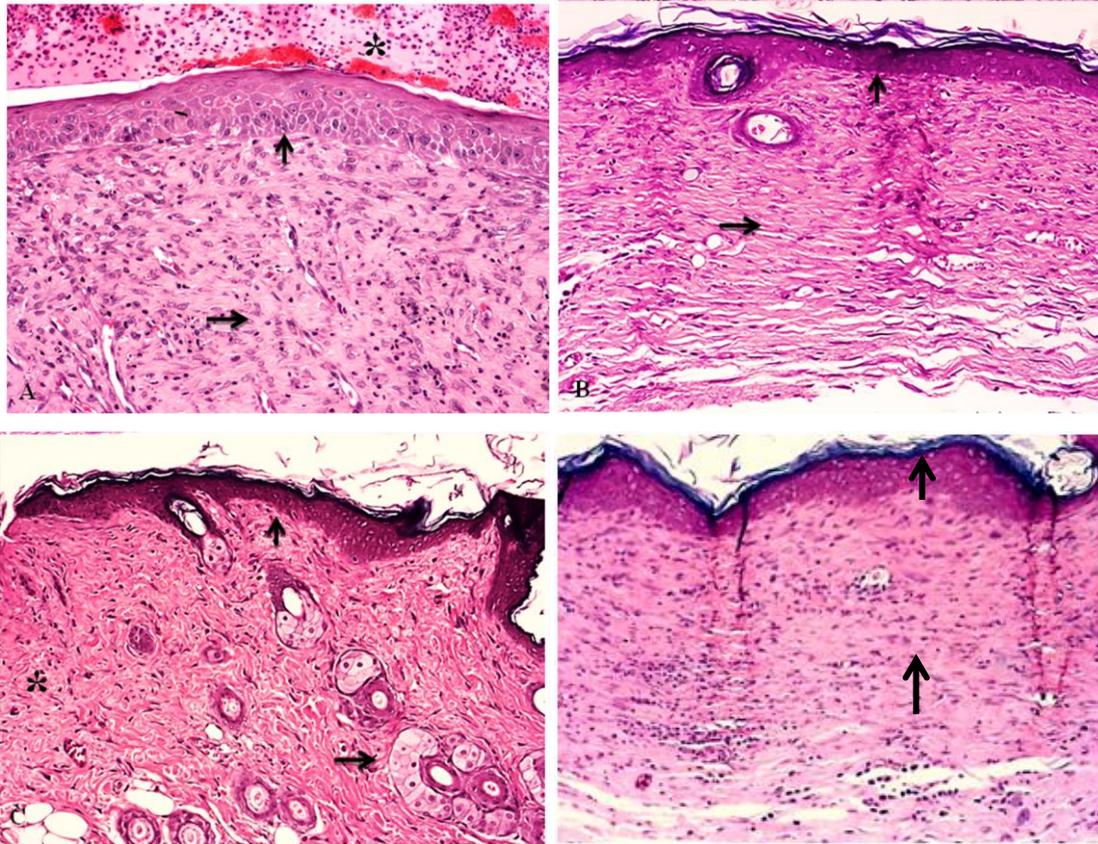
**Figura 15:** Índice de maturação do colágeno em 14 dias após a lesão



a =  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; b =  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle positivo

Percebe-se que o grupo da membrana contendo pólen apícola apresentou maior índice de maturação de colágeno, ou seja, maior substituição do colágeno tipo III pelo tipo I em relação aos outros três grupos. Quando comparamos estes dados aos de HE é possível notar a confluência dos eventos, uma vez que o único grupo que apresentou tecido de granulação organizado foi o grupo CMP, novamente sugerindo a importância do extrato nos processos de cura da pele, reduzindo os índices inflamatórios e facilitando o processo de síntese de colágeno. O grupo membrana também demonstrou índice de maturação maior em relação ao controle positivo (pomada comercial), provavelmente devido à sua própria composição, que auxiliaria nesse processo, porém ainda em escala menor que a membrana com extrato de pólen apícola.

**Figura 16:** Fotomicrografias das secções histológicas coradas em HE, 21 dias após a lesão (400x)

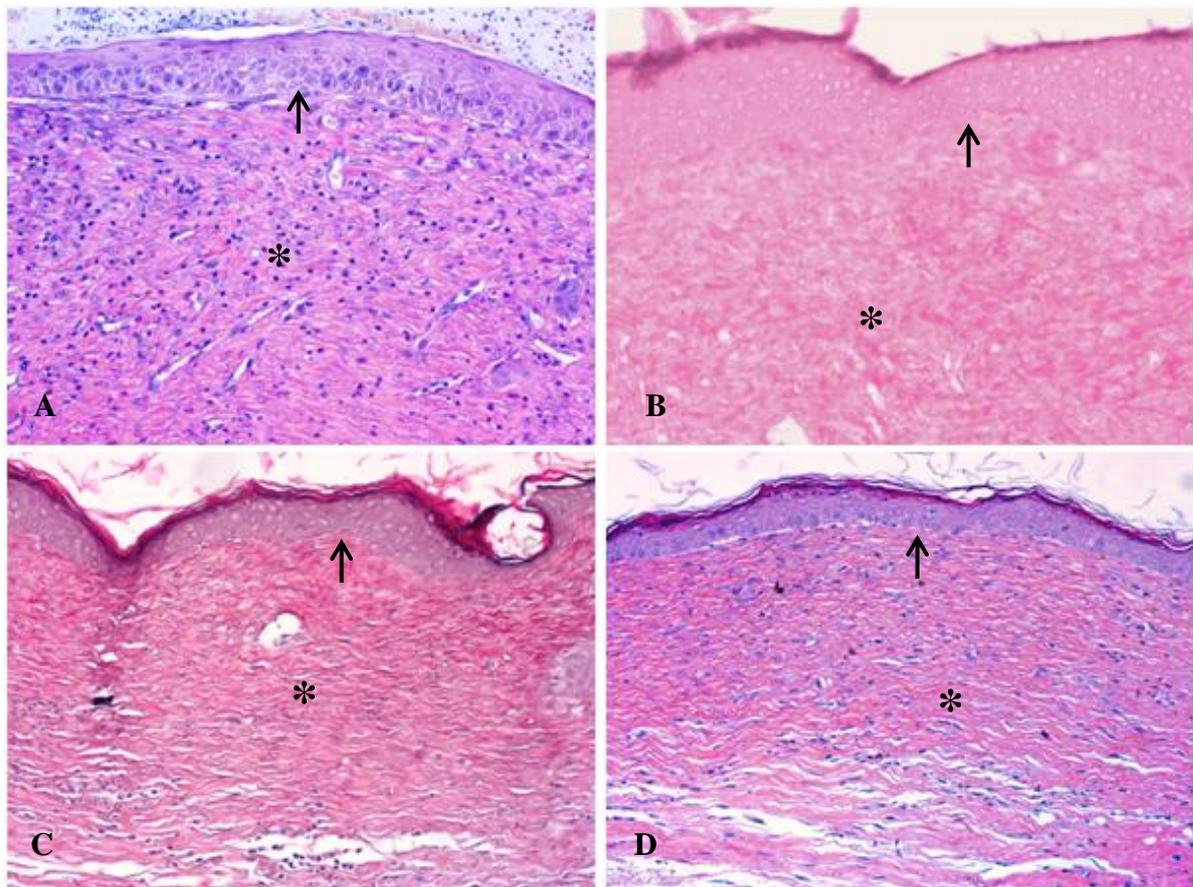


Grupo CTR: reepitelização da ferida, com epiderme com todas as suas camadas (seta menor); deposição superficial de material seroso e células inflamatórias (\*). Tecido de granulação com MEC pouco edemaciada, contendo capilares neoformados, fibroblastos, e macrófagos (seta maior) (A). Grupo CP: epiderme madura (seta menor); na derme, área cicatricial densa com fibroblastos dispostos em feixes paralelos (seta maior) (B). Grupo CMP: epiderme madura recobrendo a ferida (seta menor). Na derme, presença de folículos pilo-sebáceos (seta maior) apenas nas margens da área cicatricial (\*). Não foi observada atividade inflamatória (C). Grupo CMSP: epiderme madura (seta menor); na derme, tecido de granulação maduro, com células inflamatórias remanescentes (D).

O grupo CTR mostrou reepitelização da ferida, com a epiderme dotada de todas as suas camadas. Contudo, ainda havia deposição superficial de material seroso e células inflamatórias. Na derme, havia tecido de granulação com MEC pouco edemaciada, contendo capilares neoformados, fibroblastos, e macrófagos (Fig. 16A). O grupo CP exibiu ferida recoberta por epiderme madura, enquanto na derme há a presença de área cicatricial com escassos fibroblastos maduros dispostos em feixes paralelos à superfície. Não foram encontrados folículos pilo-sebáceos nem células inflamatórias (Fig. 16B). O grupo CMP também revelou a presença de epiderme madura recobrendo a ferida, cuja derme continha área

cicatricial caracterizada por raros fibroblastos maduros em meio a uma matriz; presença de folículos pilo-sebáceos foram encontrados apenas nas margens da ferida. Não foi observada atividade inflamatória (Fig. 16C). O grupo que recebeu a membrana sem extrato (Fig. 16D) mostrou tecido de granulação maduro, porém ainda apresentou células inflamatórias, quadro não verificado na membrana com extrato.

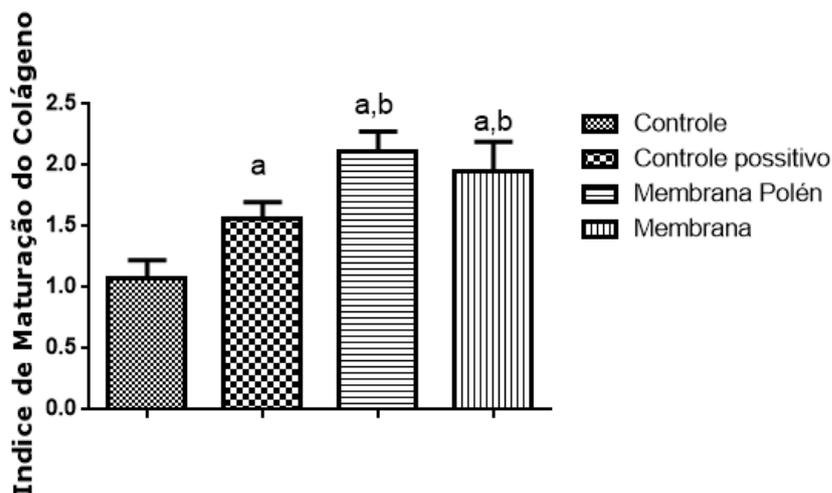
**Figura 17:** Fotomicrografias das secções histológicas coradas em picrossírius em 21 dias após a lesão (400x)



A: grupo CTRL; B: grupo GP; C: grupo GMP; D: grupo CMSP.

No grupo CTR, a reepitelização da ferida está completa (indicado pela seta) e recoberta por discreto exsudato inflamatório; o tecido de granulação na derme (indicado por \*) exibe deposição discreta de colágeno, notando-se ainda capilares e células inflamatórias (Fig. 17A). Nos demais grupos (Fig. 17B, 17C e 17D), a epiderme neoformada recobre a ferida; na derme, presença de numerosas fibras colágenas (indicadas por \*) dispostas em feixes paralelos á superfície cutânea. No CMP (Fig. 17C), os feixes colágenos parecem mais organizados. No Grupo CMSP (Fig. 17D), também se nota discreto número de células inflamatórias.

**Figura 18:** Índice de maturação do colágeno em 21 dias após a lesão



a =  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle; b =  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle positivo

O índice de maturação do colágeno no último período de observação dos grupos revelou que os dois grupos que receberam o implante da membrana alcançaram as maiores faixas, não sendo observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles (Fig. 18). Isso indica que a utilização das membranas induziu à colagenização das feridas, pois o grupo controle positivo apresentou índice inferior ao do grupo CMSP. Contudo, ao avaliarmos a margem de erro, podemos perceber que o desvio padrão do grupo CMP é menor do que o do grupo CMSP, indicando maior uniformidade nas respostas. Ao compararmos os índices de maturação do colágeno de 14 dias para 21 dias do grupo CMP, nota-se um aumento pequeno, indicando que este grupo já havia atingido um grau de colágeno tipo I no segundo período observacional.

A análise histológica demonstrou que, em feridas abertas e de espessura total induzidas experimentalmente em ratos, os grupos CP e CMP apresentaram um processo de cura mais acelerado que no grupo CTR e CMSP, em algumas fases. No sétimo dia de experimento, enquanto nestes grupos predominavam fenômenos inflamatórios, com elevado número de neutrófilos (Fig. 10A, 10D), nos demais grupos o número de neutrófilos era menor e o tecido de granulação já se mostrava mais organizado no grupo CMP, em que os fibroblastos se dispunham em paralelo à superfície da ferida (Fig. 10C).

Aos quatorze dias, no grupo CTR não ocorreu reepitelização na área média da ferida (Fig. 13A), em contraste com os demais grupos, de modo mais evidente no grupo CMP, em que a epiderme recém-formada parecia mais madura. A presença de granulomas tipo corpo estranho em torno de material amorfo (Fig. 13C), certamente restos da membrana de colágeno com pólen apícola, indica que este material é absorvido pelo organismo. Também aos vinte e

um dias, o processo de cura da ferida me mostrou muito mais avançado nos grupos CP, CMP e CMSP que no grupo CTR (Fig.16). Estes resultados foram corroborados pelas lâminas coradas com picrosirius.

Acredita-se que esses resultados superiores apresentados pela membrana contendo pólen apícola podem ser atribuídos a dois fatores: aos compostos presentes no extrato da membrana, pois como constatado o extrato empregado apresenta uma grande variedade de flavonoides e ácidos fenólicos que possuem tanto atividade antioxidante como anti-inflamatória, assim como aconteceu nos experimentos de Olczyk et al. (2016). Gomathi et al. (2003) destacam que a quercetina é um dos flavonoides que retardam a oxidação da área lesionada e morte celular por eliminação de radicais livres, elementos estes que podem retardar a cicatrização devido à inflamação, uma vez que esta resulta em uma geração contínua de espécies reativas, por isso o grupo que recebeu o implante apresentou reduzida quantidade de elementos inflamatórios desde o primeiro período observacional, comprovando a eficiência dessas substâncias no biomaterial. Uma vez que, embora o grupo da membrana sem extrato também tenha apresentado resultados importantes no processo de cura, ainda foi possível verificar elementos inflamatórios aos 21 dias, fato não verificado no grupo da membrana com extrato de pólen.

E em segundo, cabível para os dois grupos, devido à cobertura propriamente dita, uma vez que Ori et al., (2017) afirmam que a utilização de barreiras artificiais sobre a ferida auxilia na proteção contra contaminação microbiana e inflamação, pois mantém um ambiente regenerativo limpo, ajudando a acelerar a cicatrização, evitando a desidratação celular, bem como apoia a síntese de colágeno e a angiogênese. Porém, Ramos et al. (2016) destacam que além da eficiência dos biomateriais desenvolvidos, o quesito custo de produção representa um obstáculo para o desenvolvimento de novos curativos, por isso é importante a busca por novos agentes de cicatrização de feridas com menor toxicidade e custo, especialmente em plantas medicinais. No caso, aqui empregado um produto natural.

Esses resultados são bastante favoráveis ao desenvolvimento da membrana contendo extrato de pólen apícola, pois a mesma é um produto totalmente natural, havendo indicativos histológicos de sua absorção pelo organismo, que não contribuiu para reações alérgicas ou de rejeição pelo organismo e que não geraria subprodutos ao ser dispensado na natureza causando contaminação do meio, como pode acontecer nos descartes de produtos comerciais, que estariam contaminados com sangue e outros elementos, como antibióticos por exemplo.

Além disso, como o material tem condição de ser fixado com cola cirúrgica sobre o ferimento, dispensaria o uso de suturas, tornando o processo menos indolor e minimizaria os riscos de infecção e inflamação. Nem há necessidade de reaplicação, como ocorre com pomadas ou curativos, isto é, a sua substituição dar-se-ia quando o material aplicado já tivesse sido absorvido pelo organismo, representando além de conforto para o paciente uma medida de economicidade. Outro ponto a se considerar em relação ao público atendido por esta membrana, é possibilidade de auxiliar no tratamento de pessoas que sofreram lesões cutâneas extensas, funcionando como biocurativo e como agente terapêutico de cicatrização bioabsorvível, biocompatível e biodegradável.

## 6. CONCLUSÃO

As amostras de pólen apícola adquiridas mostraram-se predominantemente do mesmo tipo polínico e por isso foram consideradas monoflorais, o qual além de não apresentar estudos de toxicidade associados, ainda mostrou um alto teor de compostos bioativos. Este aspecto foi avaliado nos extratos etanólicos das amostras de modo quantitativo pela análise de polifenóis totais e flavonoides totais, mostrando um conteúdo relevante perante outros dados citados na literatura. O extrato mostrou-se efetivo na inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, um microrganismo oportunista importante em casos de infecção hospitalar.

A membrana desenvolvida não causou alterações cromossômicas significativas tanto em exposição aguda quanto crônica, indicando que seu uso pode ser considerado seguro do ponto de vista genotóxico. Além disso, sua aplicação como agente cicatrizante acelerou o processo de cura das feridas em ratos (colocar a espécie), reduzindo os índices de inflamação já nos primeiros sete dias e demonstrando uma cicatrização organizada aos 21 dias, comparáveis ao tratamento comercial, com a vantagem de ser utilizado com uma única aplicação e ser absorvido pelo tecido ao longo do tratamento.

Portanto, o material desenvolvido atendeu ao propósito de cicatrização, promovendo uma cicatrização organizada e sem elementos inflamatórios, apresentando-se como uma potencial alternativa segura e eficaz para o tratamento de lesões cutâneas em seres humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALAR, H. G.; ÇIFTÇI, G. A.; GÖGER, F.; KIRIMER, N. Activity Guided Fractionation of *Arum italicum* Miller Tubers and the LC/MS-MS Profiles. **Records of Natural Products**. Vol. 12(1), p. 64-75, 2018.

AGOSTINI, J. M. S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotermas**. Vol. 6(2), p. 1-19, 1993.

AGYARE, C.; BOAKYE, Y. D.; BEKOE, E. O.; HENSEL, A.; DAPAAH, S. O.; APPIAH, T. Review: African medicinal plants with wound healing properties. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 177, p. 85–100, 2016.

AKKOL, E. K.; ORHAN, D. D.; GURBUZ, I.; YESILADA, E. *In vivo* activity assessment of a “honey-bee pollen mix” formulation. **Pharmaceutical Biology**. P. 1–7, Early Online, 2010.

ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, . A.; REIS, F. P.; LIMA, S.O.; RIBEIRO, M. A. G.; CARDOSO, J. C. Effect of Bovine Type-I Collagen-Based Films Containing Red Propolis on Dermal Wound Healing in Rodent Model. **International Journal of Morphology**. Vol. 27(4), p.1105-1110, 2009.

ALI, F.; RAHUL; JYOTI, S.; NAZ, F.; ASHAFAQ, M.; SHAHIB, M.; SIDDIQUE, Y. H. Therapeutic potential of luteolin in transgenic *Drosophila* model of Alzheimer’s disease. **Neuroscience Letters**. Vol. 692, p. 90–99, 2019.

ALICIC, D.; ŠUBARIĆ, D.; JAŠIĆ, M.; PAŠALIĆ, H.; AČKAR, Đ. Antioxidant properties of pollen. **Hrana u zdravlju i bolesti, znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku**. Vol. 3(1), p. 6-12, 2014.

ALMAS, K.; MAHMOUD, A.; DAHLAN, A. A comparative study of propolis and saline application on human dentin: a SEM study. **Indian Journal Dentist Resourch**, New Delhi. Vol. 12, p. 21-70, 2001.

AL-SALEM, H. S.; BHAT, R. S.; AL-AYADHI, L.; EL-ANSARY, A. Therapeutic potency of bee pollen against biochemical autistic features induced through acute and sub-acute neurotoxicity of orally administered propionic acid. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 16 (120), p. 1-10, 2016. DOI 10.1186/s12906-016-1099-8

ALVES, R. F. **Análise palinológica do pólen apícola produzido no estado de Sergipe, Brasil**. Dissertação (mestrado em Ciências - Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana. Departamento de Ciências Biológicas, Feira de Santana (BA), 2013.

ARALDI, R. P.; MELO, T. C.; MENDES, T. B.; SÁ JÚNIOR, P. L.; NOZIMA, B. H. N.; ITO, E. T.; CARVALHO, R. F.; SOUZA, E. B.; STOCCO, R. C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Vol. 72, p. 74–82, 2015.

ARCHELA, E.; DALL’ANTONIA, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, vol. 34(2), p. 193-210, jul./dez. 2013.

ARNOUS, A.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Correlation of Pigment and Flavanol Content with Antioxidant Properties in Selected Aged Regional Wines from Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**. Vol. 15, p. 655-665, 2002.

ARRUDA, V. A. S.; PEREIRA, A. A. S.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical Composition. **Journal of Food Composition and Analysis**. Vol. 29, 100–105, 2013.

ARYA, A.; AL-OBAIDI, M. M. J.; SHAHID, N.; NOORDIN, M. I. B.; LOOI, C. Y.; WONG, W. F.; KHAING, S. L.; MUSTAFA, M. R. Synergistic effect of quercetin and quinic acid by alleviating structural degeneration in the liver, kidney and pancreas tissues of STZ-induced diabetic rats: A mechanistic study. **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 71, p. 183–196, 2014.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M.; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**. Vol. 117, p. 426–436, 2013.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives Toxicology**. Vol. 87, p. 949–968, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s00204-013-1070-0>.

BAJAY, J. M.; JORGE, A. S.; DANTAS, S. R. P. E. **Técnicas básicas para a realização de curativos no âmbito hospitalar. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. São Paulo (SP): Atheneu. p. 69-79, 2003.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. Vol. 41(1), p. 27-51, 2005.

BARBI, R. C. T. **Extração e quantificação de compostos fenólicos e antioxidantes da chia (*salvia hispânica l*) usando diferentes concentrações de solventes**. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Alimentos). Universidade Tecnológica do Paraná, Campo Mourão, 2016.

BARBOSA, S. L. F. ***Mimosa caesalpinifolia* Benth.: obtenção do extrato padronizado, avaliação da atividade antioxidante, da citotoxicidade e desenvolvimento de comprimidos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação demarcadores. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**. Vol. 33(2), p. 111-128, 2008.

BARRETO, A. L. S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

BARRETO, A. L. S.; BASTOS, T. S.; PIRES, J. A.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. Análise quantitativa de mastócitos na cicatrização de feridas tratadas com membranas de colágeno contendo própolis vermelha. **Interfaces Científicas – Saúde e Ambiente**. Vol. 1(2), p. 79-90, Aracaju, 2013.

BARUD, H. G. O.; SILVA, R. R.; BARUD, H. S.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; OLIVEIRA JUNIOR, O. B.; RIBEIRO, S. J. L. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 153, p. 406–420, 2016.

BASIM, E.; BASIM, H.; OZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**. Vol. 77, p. 992–996, 2006.

BORTOLI, I.; PRATO, A. L.; HROTH, A. A efetividade do laser associado a diferentes tipos de curativos na cicatrização de úlceras de pressão. **Evidência**. Vol. 16(1), p. 45-58, jan./jun., Joaçaba, 2016.

BOTTCHER-HABERZETH, S. T.; BIEDERMANN, T.; REICHMANN, E. Tissue engineering of skin. **Burns**. Vol. 36(4), 450-460, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie**. Vol. 28(1), p.25-30, 1995.

BRITO, A.; RAMIREZ, J. E.; ARECHE, C.; SEPULVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M. J. HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. **Molecules**. Vol. 19, p. 17400-17421, 2014. DOI:10.3390/molecules191117400

BRITO, D. R. B.; COSTA JÚNIOR, L. M.; GARCIA, J. L.; LOPES, S. G.; SANTOS, G. C. O.; SOUSA, J. V. S. In vitro action of *Mimosa caesalpinifolia* ketone extract on *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. **Semina: Ciências Agrárias**. Vol.38(4), p.1963-1972, 2017.

BYSTROM, L. M.; LEWIS, B. A.; BROWN, D. L.; RODRIGUEZ, E.; OBENDORF, R. I. Characterisation of phenolics by LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. ‘Montgomery’ fruits. **Food Chemistry**. Vol. 111, p. 1017–1024, 2008.

CABRERA, C.; MONTENEGRO, G. Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. **Ciencia e Investigación Agraria**. Vol. 40(1), p. 223-230, 2013.

CAMPOS, J. F.; SANTOS, U. P.; MACORINI, L. F. B.; MELO, A. M. M. F.; BALESTIERI, J. B. P.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; SOUZA, K. P.; SANTOS, E. L. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 65, p. 374-380, 2014.

CAMPOS, M. G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the

contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 51, p. 742-745, 2003.

CARDOSO, L.; USERO, R.; CATANI, S. M. M.; BARBO, M. L. P. Implante de Membranas de PLLA/Trietil-Citrato como Alternativa no Tratamento de Feridas Cutâneas. **Polímeros**. Vol. 23(6), p. 798-806, 2013.

CARDOSO, V. S.; FILGUEIRAS, M. C.; DUTRA, Y. M.; TELES, R. H. G.; ARAUJO, A. R.; PRIMO, F. L.; MAFUD, A. C.; BATISTA, L. F.; MASCARENHAS, Y. P.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTO, V.; TEDESCO, A. C.; SILVA, D. A.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS JUNIOR, J. R. Collagen-based silver nanoparticles: Study on cell viability, skin permeation, and swelling inhibition. **Materials Science and Engineering C**. Vol. 74(1), p. 382-388, 2017.

CARPES, S. T.; ALENCAR, S. M.; CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; MOURAO, G. B.; HAMINIUK, C. W. I.; LUZ, C. F. P.; MASSON, M. L. Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. **CyTA – Journal of Food**. Vol. 11(2), p. 150-161, 2013.

CARPES, S. T.; CABRAL, I. S. R.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Caracterização do potencial antimicrobiano dos extratos de pólen apícola da região sul do Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. Vol. 20(2), p. 271-277, abr./jun. 2009.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURAO, G. B.; ALENCAR, S. M.; MASSON, M. L. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**. Vol. 31(7), p. 1660-1664, 2008.

CARTAXO, S. L. **Diversidade e uso de plantas medicinais em uma área de caatinga em Aiuaba-CE, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biosproecção Molecular). Universidade Regional do Cariri, Crato (CE), 2009.

CARVALHO, H. M. M. **Análise imunológica e genotóxica em *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar tratados com ciclofosfamida**. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Molecular). Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

CASTAÑEDA, N. O. G. **Nanofibras de aplicación farmacológica para el tratamiento de lesiones cutâneas**. Dissertação (Mestrado em Ciência Avançada). Instituto Politécnico Nacional, México, 2017.

CHAUDHARI, A. A.; VIG, K. BAGANIZI, D. R.; SAHU, R.; DIXIT, S.; DENNIS, V.; SINGH, S. R.; PILLAI, S. R. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. **International Journal of Molecular Science**. Vol. 17, 2016.

CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. Vol. 7(2), p. 40-46. Abr/Jun., 1997.

CHEN, G.; LI, X.; SALERI, F.; GUO, M. Analysis of Flavonoids in *Rhamnus davurica* and Its Antiproliferative Activities. **Molecules**. Vol. 21, p. 1275, 2016. DOI:10.3390/molecules21101275

CHEQUER, F. M. D. **Utilização do testes de micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azo corantes disperse red 1, disperse Orange 1, disperse red 13**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2008.

CHIN, G. A.; DIEGELMANN, R. F.; SCHULTZ, G. S. *Cellular and Molecular Regulation of Wound Healing*. In: FALABELLA AF; KIRSNER RS. **Wound Healing**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 17-38.

CHOUDHARI, M. K.; PUNEKAR, S. A.; RANADE, R. V.; PAKNIKAR, K. M. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 141, p. 363– 367, 2012.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVAO, I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETIN, R. REVIEW: The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**. Vol. 23(3), p. 143–151, 2008. doi:10.1093/mutage/gem051

COLON, M.; NERIN, C. Role of Catechins in the Antioxidant Capacity of an Active Film Containing Green Tea, Green Coffee, and Grapefruit Extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 60, p. 9842–9849, 2012. DOI: 10.1021/jf302477y

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. 3ª Ed. Jaboticabal (SP): FUNEP, 2006.

CUI, Z.; HOUWELIN, M. Phosphatidylcholine and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**. Vol. 1585, p. 87–96, 2002.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Unicamp, 2005.

DANTAS, M. D. M.; CAVALCANTE, D. R. R.; ARAUO, F. E. N.; BARRETO, S. R.; ACIOLE, G. T. S.; PINHEIRO, A. L. B.; RIBEIRO, M. A. G.; LIMA-VERDE, I. B.; MELO, C. M.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE JUNIOR, R. L. C. Improvement of dermal burn healing by combining sodium alginate/chitosan-based films and low level laser therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. Vol. 105, p. 51–59, 2011.

DAVID, A. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**. Vol. 10(20), p. 84, 2016.

DE-MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, L. M.; MOREIRA, M. M.; DELERUE-MATOS, C.; FRIETAS, A. S. Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. **Journal of Food Biochemistry**. Vol. 42, 2018. DOI: 10.1111/jfbc.12536

DENISOW, B.; DENISOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Vol. 96, p. 4303–4309, 2016.

DINGA, C.; ZHANGB, M.; LIA, G. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 119, p. 194–201, 2015.

DREIFKE, M. B.; JAYASURIYA, A. A.; JAYASURIYA, A. C. Current wound healing procedures and potential care (Review). **Materials Science and Engineering C**. Vol. 48, p. 651–662, 2015.

DRYDEN, S. V; SHOEMAKER, W. G.; KIM, J. H. Wound Management and Nutrition for Optimal Wound Healing. **Atlas Oral Maxillofacial Surg Clin**. Vol. 21, p. 37-47, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cxom.2012.12.008>

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. Vol. 26(2), p. 446-452, Campinas, 2006.

DULONG, V.; KOUASSI, M. C.; LABAT, B.; CERF, D. L.; PICTON, L. Antioxidant properties and bioactivity of Carboxymethylpullulan grafted with ferulic acid and of their hydrogels obtained by enzymatic reaction. **Food Chemistry**. Vol. 262, p. 21-29, 2018.

EL-ASELY, A. M.; AMANY A. ABBASS, A. A.; AUSTIN, B. Honey bee pollen improves growth, immunity and protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) against infection with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**. Vol. 40, p. 500-506, 2014.

EL-FIKY, S. A.; FARAG, I. M.; ZOHEIR, K. M. A.; HASSAN, N. H. A.; ELALFY, H. G. M. The protective Role Of Honey-Bee Products Against The Genotoxic Effects Of Cyclophosphamide in Male Mice. **Journal of Applied Sciences Research**. Vol. 9(8), p. 4745-4758, 2013.

EL-NAGGAR, S. A.; ALM-ELDEEN, A. A.; GERMOUSH, M. O.; EL-BORAY, K. F.; ELGEBALY, H. A. Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. **Pharmaceutical Biology**. Vol. 53(2), p. 235–241, 2015.

ERDTMAN, G. The acetolysis method: a revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**. Vol. 54(4), p. 561-564, 1960.

ESTEVINHO, L. M.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A. P.; FEAS, X. Portuguese bee pollen: palynological study nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**. Vol. 47, p. 429-435, 2012.

FAHMY, M.A, HASSAN, N. H. A.; EL-FIKY, S.A.; ELALFY, H.G. A mixture of honey bee products ameliorates the genotoxic side effects of cyclophosphamide. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. Vol. 5(8), p. 638-644, 2015.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**. Vol. 43(2), p. 211-8, 2009.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. Vol. 18 (1), p. 23–36, 2006.

FATRCOVÁ-ŠRAMKOVÁ, K.; NÔZKOVÁ, J.; KACANIOVÁ, M.; MARIÁSSYOVÁ, M.; ROVNÁ, K.; STRICÍK, M. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. Vol. 48, p. 133–138, 2013.

FEAS, X. VÁZQUEZ-TATO, M. P.; ESTEVINHO, L.; SEIJAS, J. A.; IGLESIAS, A. Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. **Molecules**. Vol. 17, p. 8359-8377, 2012.

FERREIRA, R. C. **Avaliação das características físico-químicas e microbiológicas do pólen da *Melipona scutellaris* L. submetido a diferentes processos de desidratação**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – UFBA. Salvador, 2012.

FRADE, M. A. C.; COUTINHO NETTO, J.; FOSS, N. T.; ASSIS, R. V. C.; ANDRADE, T. A. M. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Vol. 87(1), p. 45-51, 2012.

FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. Vol. 45, p. 113–136, 1998.

FRISCIC, M.; BUCAR, F.; PILEPIC, K. H. LC-PDA-ESI-MSn analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. **Journal of Mass Spectrometry**. Vol. 51, p. 1211–1236, 2016. DOI 10.1002/jms.3844.

GABRIELE, M.; PARRI, E.; FELICOLI, A.; SAGONA, S.; POZZO, L.; BIONDI, C.; DOMENICI, V.; PUCCI, L. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee pollen of different botanic origins. **Italian Journal Food Science**. Vol. 27, 2015.

GALALY, S. R.; ABDELLA, E. M.; MOHAMMED, H. M.; KHADRAWY, S. M. Effects of royal jelly on genotoxicity and nephrotoxicity induced by valproic acid in albino mice. **Beni-suef University Journal of Basic and Applied Sciences**. Vol. 3, p. 1-15, 2014.

GARCÍA, M.; PÉREZ-ARQUILLUE, C.; JUAN, T.; JUAN, M. I.; HERRERA, A. Note: pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science Technology International**, Cambridge. Vol. 7(2), p. 155-158, 2001.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodonto pathic bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo. Vol. 33(4), p. 365-369, 2002.

GELSE, K.; POSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Vol. 55, p. 1531– 1546, 2003.

GHELDOLF, N. WANG, X-H. ENGESETH, N. J. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 50, p. 5870–5877, 2002.

GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato**. Dissertação (mestrado em Bioengenharia). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

GÖGER, F.; KOSE, Y. B.; GÖGER, G.; DEMIRCI, F. Phytochemical characterization of phenolics by LC-MS/MS and biological evaluation of *Ajuga orientalis* from Turkey. **Bangladesh Journal of Pharmacological**. Vol.10, p. 639-644, 2015.

GOMATHI, K.; GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. **Biomaterials**. Vol. 24, p. 2767–2772, 2003.

GOMEZ-CARAVACA, A. M.; GOMEZ, ROMERO, M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIERRE, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. Vol. 41, p. 1220–1234, 2006.

GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; GOMATHI, K.; CHITRA, K.; SEHGAL, P. K.; JAYAKUMAR, R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. **Biomaterials**. Vol. 25 (10), p.1911-7, 2004.

GUIMARÃES-BEELLEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BEELLEN, R.; ARAÚJO FILHO, J.; OLIVEIRA, S. G. Characterization Of Condensed Tannins From Native Legumes Of The Brazilian Northeastern Semi-Arid. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.). Vol. 63(6), p.522-528, November/December 2006.

GYORI, B. M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJAN, P. S.; HSU, D.; CLEMENT, M.V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology**. Vol. 2 p. 457–465, 2014.

HABIB, H. M.; PLATAT, C.; MEUDEEC, E.; CHEYNIER, V.; IBRAHIM, W. H. Polyphenolic compounds in date fruit seed (*Phoenix dactylifera*): characterisation and quantification by using UPLC-DAD-ESI-MS. **Journal of Science and Food Agriculture**. Vol. 94, p. 1084–1089, 2014. DOI 10.1002/jsfa.6387.

HAMADA, S.; OHYAMA, W.; TAKASHIMA, R.; SHIMADA, K.; MATSUMOTO, K.; KAWAKAMI, S.; UNO, F.; SUI, H., SHIMADA, Y.; IMAMURA, T.; MATSUMURA, S.; SANADA, H.; INOUE, K., MUTO, S.; OGAWA, I.; HAYASHI, A.; TAKAYANAGI, T.; OGIWARA, Y.; MAEDA, A.; OKADA, E.; TERASHIMA, Y.; TAKASAWA, H.; NARUMI, K., WAKO, Y.; KAWASAKO, K.; SANO, M.; OHASHI, N.; MORITA, T.; KOJIMA, H.; HONMA, M.; HAYASHI, M. Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) – Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). **Mutation Research**.780-781:2–17, 2015.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**. Vol. 18, p. 45–51, 2003.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. Jr. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research**. 245:245–249, 1990.

HAYASHI, M.; TICE, R.; MACGREGOR, J.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D.; KIRSH-VOLDERS, M. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**. Vol. 312, p. 293–304, 1994.

HEUSER, V. D.; ANDRADE, V. M.; PERES, A.; BRAGA, L. M. G. M.; CHIES, J. A. B. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**. Vol. 32, p. 1223–1229, 2008.

HIRATA, H. H.; MUNHOZ, M. A. S.; PLEPIS, A. M. G.; MARTINS, V. C. A.; SANTOS, G. R.; GALBEANO, E. A.; CUNHA, M. R. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats. **Injury, International Journal of the Care of the Injured**. Vol. 46, p. 1215–1222, 2015.

HOFMANN, T.; NEBEHAJ, E.; ALBERT, L. Antioxidant properties and detailed polyphenol profiling of Europeanhornbeam (*Carpinus betulus* L.) leaves by multiple antioxidant capacity assays and high-performance liquid chromatography/multistage electrospray mass spectrometry. **Industrial Crops and Products**. Vol. 87, p. 340–349, 2016.

HUANG, H.; SHENA, Z.; GENGA, Q.; WUA, Z.; SHIA, P.; MIAO, X. Protective effect of Schisandra chinensis bee pollen extract on liver and kidney injury induced by cisplatin in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Vol. 95, p. 1765–1776, 2017.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**. Vol. 19(1), p. 97-108, jan./mar., Araraquara, 2008.

HUBNER, P. **Desenvolvimento de filmes de gelatina contendo zeólita clinoptilolita impregnada com íons prata e avaliação das propriedades antimicrobianas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

IBRAHIM, R. M.; EL-HALAWANY, A. M.; SALEH, D. O.; NAGGAR, E. M. B. E.; EL-SHABRAWY, A. E-R. O.; EL-HAWARY, S. S. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *Securigera securidaca* flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 25, p. 134–141, 2015.

JANG, S-A.; PARKA, D. W.; KWONA, J. E.; SONGA, H. S.; PARKA, B.; JEONA, H.; SOHNB, E-H.; KOOC, H. J.; KANG, S. C. Quinic acid inhibits vascular inflammation in TNF- $\alpha$ -stimulated vascular smooth muscle cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Vol. 96, p. 563–571, 2017.

JIN, G.; PRABHAKARAN, M. P.; KAI, D.; ANNAMALAI, S. K.; ARUNACHALAN, K. D.; RAMAKRISHNA, S. Tissue engineered plant extracts as nanofibrous wound dressing. **Biomaterials**. Vol. 34, p. 724-734, 2013.

KALAYACIOGLU, Z.; KAYGUSUZ, H.; DOKER, S.; KOLAYLI, S.; ERIM, F.B. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. **LWT – Food Science and Technology**. Vol. 84, p. 402-408, 2017.

KANNO, T. Y. N.; SENSIATE, L. A.; PAULA, N. A.; SALLES, M. J. S. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. Vol. 45, n° 2, abr./jun., 2009.

KARAMPOUR, N. S.; HEMMATI, A. A.; MALMIR, A. The anxiolytic effect of bee pollen hydroalcoholic extract in mice. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**. Vol. 7, n° 3, p. 301-305, 2017.

KARAR, M. G. E.; KUHNERT, N. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (Crataegutt Tropfen). **Journal of Chemical Biology & Therapeutics**. Vol. 1(1), 2015. DOI: 10.4172/2572-0406.1000102.

KARASAWA, T.; STEYGER, P. S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity, **Toxicology Letters**. Vol. 237, p. 219–227, 2015.

KASKONIENE, V.; RUOCKUVIENE, G.; KASKONAS, P.; AKUNECA, I.; MARUSKA, A. Chemometric Analysis of Bee Pollen Based on Volatile and Phenolic Compound compositions and Antioxidant Properties. **Food Analytical Methods**, 2014.

KHAN, R.; KHAN, M. H.; BEY, A. Use of collagen as an implantable material in the reconstructive procedures - an overview. **Biology and Medicine**. Vol. 3(4), p. 25-32, 2011.

KOKANE, D. D.; MORE, Y. R.; KALE, B. M.; NEHETE, N. M.; MEHENDALE, C. P.; GADGOL, H. C. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal Ethnopharmacol**. Vol. 124, p. 311–315, 2009.

KOMOSINSKA-VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAZMIERCZAK, J.; MENCER, L.; OLCZYK, K. Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 2015, Article ID 297425, 6 p., 2015.

KOSTI, A. Z.; BARA, M. B.; STANOJEVI, S. P.; MILOJKOVI-OPSENICA, D. M.; TESIC, Z. L.; SIKOPARIJA, B.; RADISIC, P.; PRETOVIC, M.; PESIC, M. B. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. **LWT - Food Science and Technology**. Vol. 62, p. 301-309, 2015.

KRAUJALYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; PUKALSKAS, A.; CESONIENE, L.; DAUBARAS, R.. Antioxidant properties and polyphenolic compositions of fruits from different European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes. **Food Chemistry**. Vol. 141, p. 3695–3702, 2013.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Hindawi Publishing Corporation. **The ScientificWorld Journal**. Vol. 2013, Article ID 162750, 16 pages. DOI: 10.1155/2013/162750

KUMAR, V.; ABAS, A.; ASTER, J. C. *Inflamação e Reparo*. In: \_\_\_\_\_ **Robbins & Cotran. Patologia: As Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2016, p. 71-113.

LEBLANC, B.W., DAVIS, O.K., BOUE, S., DELUCCA, A., DEEBY, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. **Food Chemistry**. Vol.115, p. 1299-1305, 2009.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Review: Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 221, p. 1–22, 2001.

LEVENSON S.M.; GEEVER E.F.; CROWLEY L.V.; OATES J.F.; BERARD C.W.; ROSEN H. The healing of rat skin wounds. **Annals of surgery**. Vol. 161(2), p. 293-308, 1965.

LI, Z. H.; GUO, H.; XU, W. B.; GE, J.; LI, X.; ALIMU, M.; HE, D. J. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS. **Journal of Chromatographic Science**. Vol. 54(5), p. 805–810, 2016. DOI: 10.1093/chromsci/bmw016

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; KONG, M.; LI, L.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; CHEN, H.; QIN, W.; WU, H.; CHEN, S. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**. Vol. 21, 1374, 2016; doi:10.3390/molecules21101374

LIU, F. F.; ANG, C. Y. W.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington , v. 48, p. 3.364-3.371, 2000.

LOPEZ-LAZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. Vol. 9, p. 31-59, 2009.

LOZADA, A. T.; CORREA, V. F. Fisiologia de la reparación de las heridas y dianas terapéuticas en la cicatrización anormal. **Piel**. Vol. 32(4), p. 187-254, 2017. DOI: 10.1016/j.piel.2016.08.009.

LU, G.; LING, K.; ZHAO, P.; XU, Z.; DENG, C.; ZHENG, H.; HUANG, J.; CHEN, J. A novel in situ-formed hydrogel wound dressing by the photocross-linking of a chitosan derivative. **Wound Repair and Regeneration**. Vol. 18(1), p. 70-79, 2010.

LUO, Y.; SUN, G.; DONG, X.; WANG, M.; QIN, M.; YU, Y.; SUN, X. Isorhamnetin Attenuates Atherosclerosis by Inhibiting Macrophage Apoptosis via PI3K/ AKT Activation and HO-1 Induction. **Plos One**. Vol. 10(3), p. 1-19, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0120259.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrizacao: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **Anais brasileiros de Dermatologia**. Vol. 78(5), p. 525-542, Rio de Janeiro, 2003.

MARTÍN-MUÑOZ, M. F.; BARTOLOME, B.; CAMINO, M. BOBOLEA, I. GARCIA ARA, M. C.; QUIRCE, S. Bee pollen: a dangerous food for allergic children. Identification of responsible allergens. **Allergologia et Immunopathologia**. Vol. 38(5), p. 263-5, Espanha, 2010. DOI: 10.1016/j.aller.2009.12.003.

MARTINS, M. C. T. **Pólen apícola brasileiro: valor nutritivo e funcional, qualidade e contaminantes inorgânicos**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP, 2010.

MARUYAMA, H.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; HARA, H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 10, n. 30, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/30>>.

MELO, I. L. P.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. Vol. 68(3), p. 346-353, 2009.

MENEZES, J. D. S. **Compostos bioativos do Pólen apícola**. Dissertação (mestrado – pós-graduação em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia: Faculdade de Farmácia. Salvador, 2009.

MENEZES, J. D. S.; MACIEL, L. F.; MIRANDA, M. S.; DRUZIAN, J. I. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista Instituto Adolfo Lutz**. Vol. 69(2), p. 233-42, São Paulo, 2010.

MIHAJLOVIC, L.; VLJEVIC, J. R.; BURAZER, L.; SMILJANIC, K.; VELICKOVIC, T. C. Composition of polyphenol and polyamide compounds in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) pollen and sub-pollen particles. **Phytochemistry**. Vol. 109, p. 125–132, 2015.

MODRO, A. F. H.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C. Origem de cargas de pólen de colmeias de abelhas africanizadas em Piracicaba, SP. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 41, nº 11, p. 1944-1951, Nov, 2011.

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics**. Vol. 463, p. 127–136, 2014.

MOHAMED, N. A.; AHMED, O. M.; HOZAYEN, W. G.; AHMED, M. A. Ameliorative effects of bee pollen and date palm pollen on the glycemic state and male sexual dysfunctions in streptozotocin-Induced diabetic wistar rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Vol. 97, p. 9–18, 2018.

MOHDALY, A. A. A.; MAHMOUD, A. A.; ROBY, M. H. H.; SMETANSKA, I.; RAMADAN, M. F. Phenolic extract from propolis and bee pollen: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Food Biochemistry**, 2015. DOI: 10.1111/jfbc.12160.

MONÇAO, N. B. N.; ARAUJO, B. Q.; SILVA, J. N.; LIMA, D. J. B.; FERREIRA, P. M. P.; AIROLDI, F. P. S.; PESSOA, C.; CITO, A. M. G. L. Assessing Chemical Constituents of *Mimosa caesalpiniiifolia* Stem Bark: Possible Bioactive Components Accountable for the

Cytotoxic Effect of *M. caesalpinifolia* on Human Tumour Cell Lines. **Molecules**. Vol. 20, p. 4204-4224, 2015. doi:10.3390/molecules20034204

MORGANO, M. A.; MARTINS, M. C. T.; RABONATO, L. C.; MILANI, R. F.; YOTSUYANAGI, K.; RODRIGUEZ-AMAYALA, D. B. Inorganic Contaminants in Bee Pollen from Southeastern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 58, p. 6876–6883, 2010.

MORAES, P. R. F. S. **Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos**. Dissertação (mestrado em Ciências: Bioengenharia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP. USP, 2013.

MORAIS, M.; MOREIRA, L.; FEAS, X.; ESTEVINHO, L. M. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 49, p. 1096–1101, 2011.

MOURA, L. I. .; DIAS, A. M. A.; CARVALHO, E.; SOUSA, H. C. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review. **Acta Biomaterialia**. Vol. 9, p. 7093–7114, 2013.

MUNOYATH, S. K.; SATHISHWARAN, J.; PRASAD, K. Efficacy of human amniotic membrane and collagen in maxillofacial soft tissue defects – A comparative clinical study. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**. Vol. 27, p. 786–790, 2015.

NASCIMENTO, A. M. C. B. **Desenvolvimento de barra proteica de pólen apícola e gergelim com potencial antioxidante**. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

NASCIMENTO, I. A.; BRAZ-FILHO, R.; CARVALHO, M. G.; MATHIAS, L.; FONSECA, F. A. Flavonoides e outros compostos isolados de *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. **Química Nova**. Vol. 35, p. 2159–2164, 2012.

NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 23, p. 851-860, 2013.

NEGRI, G.; TEIXEIRA, E. W.; ALVES, M. L. T. M. F.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P.; BORGUINI, R. G.; SALATINO, A. Hydroxycinnamic Acid Amide Derivatives, Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Extracts of Pollen Samples from Southeast Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 59, p. 5516–5522, 2011.

NUNES, P. S.; BEZERRA, M. S.; COSTA, L. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE JR., R. L. C.; RODRIGUES, M. O.; BARIN, G. B.; SILVA, F. A.; ARAUO, A. A. S. Thermal characterization of usnic acid/collagen-based films. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. Vol. 99, p. 1011–1014, 2010.

OLCZYK, P.; KOPROWSKI, R.; KAZMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; WOJTYCZKA, R.; STOJO, J.; OLCZYK, K.; KOMOSINSKA-VASSEV, K. Bee Pollen as a Promising Agent in

the Burn Wounds Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Vol. 2016, Article ID 8473937, 12 p., 2016.

OLIVEIRA, R. C.; QUEIROZ, S. C. N.; LUZ, C. F. P.; PORTO, R. S.; RATH, S. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. **Chemosphere**. Vol. 163, p. 525-534, 2016.

OLSEN, D.; YANG, C.; BODO, M.; CHANG, R.; LEIGH, S.; BAEZ, J.; CARMICHAEL, D.; PERALA, M.; HAMALAINEN, E-R.; JARVINEN, M.; POLAREK, J. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Vol. 55, p. 1547-1567, 2003.

OMAR, W. A. W.; AZHAR, N. A.; FADZILAH, N. H.; KAMAL, N. N. S. N. M. Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Vol. 6(3), p. 265-269, 2016.

ORI, F.; DIETRICH, R.; GANZ, C.; DAU, M.; WOLTER, D.; KASTEN, A.; GERBER, T.; RERICH, B. Silicon-dioxide\_polyvinylpyrrolidone as a wound dressing for skin defects in a murine model. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**. Vol. 45, p. 99-107, 2017.

OU, S.; KWOK, K. C. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Vol. 84, p. 1261-1269, 2004. DOI: 10.1002/jsfa.1873.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FEAS, X.; ESTEVINHO, L. M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 63, p. 233-239, 2014.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs**. Vol. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.

PAUNICA-PANEA, G.; FICAI, A.; MARIN, M. M.; MARIN, S.; ALBU, M. G.; CONSTANTIN, V. D.; DINU-PÎRVU, C.; VULUGA, Z.; COROBEA, M. C.; GHICA, M. V. New Collagen-Dextran-Zinc Oxide Composites for Wound Dressing. **Journal of Nanomaterials**. Vol. 2016, Article ID 5805034, 7 pages, 2016.

PEDROSO, M. G. V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química de São Paulo. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

PEREIRA, R. M. S.; ANDRADES, N. E. D.; PAULINO, N.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; MARCUCCI, M. C.; FAVERO, G. M.; NOVAK, E. M.; BYDLOWSKI, S. P. Synthesis and Characterization of a Metal Complex Containing Naringin and Cu, and its Antioxidant, Antimicrobial, Antiinflammatory and Tumor Cell Cytotoxicity. **Molecules**. Vol. 12, p. 1352-1366, 2007.

PEREZ-MATEOS, M.; BRAVO, L.; GOYA, L.; GOMEZ-GUILLEN, C.; MONTERO, P. Quercetin properties as a functional ingredient in omega-3 enriched fish gels fed to rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Vol. 85, p. 1651-1659, 2005. DOI: 10.1002/jsfa.2164

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. Vol. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, B.; CACIAGLI, F.; RICCIO, E.; REALI, D.; SARIC, A.; BALOG, T.; LIKIC, S.; SCARPATO, R. Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Vol. 45, p. 4122-4128, 2010.

POOL, I. M. P. **Obtención de andamio bi-capa, PLLA-gelatina, con geometria hexagonal de poro para posible uso en quemaduras profundas**. Dissertação (Maestro en Ciencias Materiales Poliméricos). Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México, 2018.

PLUMB, G. W.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C.; WILLIAMSON, G. Antioxidant properties of gallocatechin and prodelphinidins from pomegranate peel. **Redox Report**. Vol. 7(1), p. 41-46, 2002. DOI: 10.1179/135100002125000172

PREMRATANACHAI, P.; CHANCHAO, C. Review of the anticancer activities of bee products. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. Vol. 4, n. 5, p. 337-44, 2014.

PUKALSKIENĖ, M.; SLAPŠYTĖ, G.; DEDONYTĖ, V.; LAZUTKA, J. R.; MIERAUSKIENĖ, J.; VENSKUTONIS, P. R. Genotoxicity and antioxidant activity of five *Agrimonia* and *Filipendula* species plant extracts evaluated by comet and micronucleus assays in human lymphocytes and Ames Salmonella/microsome test. **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 113, p. 303–313, 2018.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAMOS, A. F. N.; MIRANDA, J. L. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. Vol. 13(4), p. 698, 2007.

RAMOS, M. V.; ALENCAR, N. M. N.; OLIVEIRA, R. S. B.; FREITAS, L. B. N.; ARAGAO, K. S.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; BRITO, G. A. C.; FIGUEIREDO, I. S. T. Wound healing modulation by a latex protein-containing polyvinyl alcohol biomembrane. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. Vol. 389, p.747–756, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REIS, A. C. P. A. **Contributos para o desenvolvimento de fagoterapias para infecções hospitalares por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica em Saúde). Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto. Instituto Politécnico do Porto. Porto (Portugal), 2011.

REZAPOUR-LACTOEE, A.; YEGANEH, H.; OSTAD, S. N.; GHARIBI, R.; MAZAHERI, Z.; AI, J. Thermoresponsive polyurethane/siloxane membrane for wound dressing and cell sheet transplantation: In-vitro and in-vivo studies. **Materials Science and Engineering C**. Vol. 69, p. 804–814, 2016.

REZENDE NETO, J. M. **Caracterização de membranas de colágeno modificado com extrato de frutos de *Genipa americana* L. e avaliação histomorfológica do efeito sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Tiradentes: RENORBIO, Aracaju, 2011.

RIBEIRO, J. G.; SILVA, R. A. Estudo comparativo da qualidade de pólen apícola fresco, recém processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas. **Tecnologia & Desenvolvimento Sustentável**, Ano 1, março 2007.

RIDGWAY, N. D. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. Vol. 48(1), p. 20–38, 2013. DOI: 10.3109/10409238.2012.735643

RIVERA, N.; LOPEZ, P. Y.; ROJAS, M.; FORTOUL, T. I.; REYNADA, D. Y.; REYES, A. J.; RIVERA, E.; BELTRAN, H. I.; MALAGON, F. Antimalarial efficacy, cytotoxicity, and genotoxicity of methanolic stem bark extract from *Hintonia latiflora* in a *Plasmodium yoelii* yoelii lethal murine malaria model. **Parasitology Research**. Vol. 113, p. 1529–1536, 2014.

ROCHA, J. F. M. **Avaliação do efeito de armazenamento na qualidade do pólen apícola**. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Instituto Politécnico Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal, 2013.

RODEIRO, I.; CANCINO, L.; GONZÁLEZ, J. E.; MORFFI, J.; GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, R. M.; NUÑEZ, A.; DELGADO, R. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**. Vol. 44, p. 1707–1713, 2006.

ROMANO, I.; AYADI, F.; RIZZELLO, L.; SUMMA, M.; ATHANASSIOU, A. Controlled antiseptic/eosin release from chitosan-based hydrogel modified fibrous substrates. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 131, p. 306–314, 2015.

RZEPECKA-STOJKO, A.; STOJKO, J.; JASIK, K.; BUSZMAN, E. Anti-Atherogenic Activity of Polyphenol-Rich Extract from Bee Pollen. **Nutrients**. Vol. 9, p. 1369, 2017.

SAMBANTHAMURTHI, R.; TAN, Y.; SUNDRAM, K.; ABEYWARDENA, M.; SAMBANDAN, T. G.; RHA, C.; SINSKEY, A. J.; SUBRAMANIAM, K.; LEOW, S-S.; HAYES, K. C.; WAHID, M. B. Oil palm vegetation liquor: a new source of phenolic bioactives. **British Journal of Nutrition**. Vol. 106, p. 1655–1663, 2011. DOI: 10.1017/S0007114511002121

SAMPAIO, W. C.; CARVALHO, L. A. N.; CARNEIRO, M. L. B. Avanços no desenvolvimento de biomateriais visando tratamento de feridas crônicas. **Unieuro**, 2018.

SANTOS, F. A. R. Identificação botânica do pólen apícola. **Magistra**. Vol. 23, número especial, outubro, Cruz das Almas-BA, 2011.

SANTOS, J. B.; PORTO, S. G.; SOSTIZZO, L. R. Z.; ANTONIAZZI, J. L.; ECHER, I. C. **Avaliação e tratamento de feridas: orientações aos profissionais de saúde**. Hospital das Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre (RS), 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/34755>>. Acesso em: 19/07/2017.

SANTOS, M. E. P.; MOURA, L. H.; MENDES, M. B.; ARCANJO, D. D.; MONÇÃO, N. B.; ARAÚJO, B. Q.; LOPES, J. A.; SILVA-FILHO, J. C.; FERNANDES, R. M.; OLIVEIRA, R. C.; CITÓ, A. M.; OLIVEIRA, A. P. Hypotensive and vasorelaxant effects induced by the ethanolic extract of the *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae) inflorescences in normotensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 120–128, 2015.

SATTLER, J. A. G. **Quantificação das vitaminas antioxidantes E ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\sigma$ -tocoferol), C (ácido ascórbico), pró-vitamina A ( $\alpha$ -,  $\beta$ -caroteno) e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil**. Dissertação (mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos. São Paulo, 2013.

SATTLER, J. A. G.; MELO, I. L. P.; GRANATO, D.; ARAÚJO, E.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; SATTLER, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil: A screening study. **Food Research International**. Vol. 77, p. 82–91, 2015.

SCHANUEL, F. S.; SANTOS, K. S.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; OLIVEIRA, M. G. Combined nitric oxide-releasing poly(vinyl alcohol) film/F127hydrogel for accelerating wound healing. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Vol. 130, p. 182–191, 2015.

SHEMESH, M.; ZILBERMAN, M. Structure–property effects of novel bioresorbable hybrid structures with controlled release of analgesic drugs for wound healing applications. **Acta Biomaterialia**. Vol. 10, p. 1380–1391, 2014.

SILVA, M.J.D.; CARVALHO, A.J.S.; ROCHA, C.Q.; VILEGAS, W.; SILVA, M.A.; GOUVÊA, C.M.C.P. Ethanolic extract of *Mimosa caesalpinifolia* leaves: Chemical characterization and cytotoxic effect on human breast cancer MCF-7 cell line. **South African Journal of Botany**. Vol. 93, p. 64–69, 2014b.

SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W.; SILVA, M. A.; MOURA, C. F.; RIBEIRO, F. A.; SILVA, V. H.; RIBEIRO, D. A. Mimosa (*Mimosa caesalpinifolia*) prevents oxidative DNA damage induced by cadmium exposure in Wistar rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 8, p. 567–574, 2014.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. Vol. 71(3), p. 530-9, 2012.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research**. Vol. 488, p. 151–169, 2001.

SIMIRGIOTIS, M. J.; BENITES, J.; ARECHE, C.; SEPULVEDA, B. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**. Vol. 20, p. 11490-11507, 2015. DOI:10.3390/molecules200611490.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUZA, C. S. M. **Diretrizes para a conservação da espécie *Mimosa caesalpinifolia* Benth., Macaíba – RN**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2012.

SOUZA, I. C. L. **Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Tiradentes. Aracaju, 2013.

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**. Vol. 12, p. 679-693, 2007.

TAMAYO-CHUCA, D. U.; GARZA-GONZÁLEZ, A. G. Papel de CYP2B6 y ALDH1A1 en la resistencia farmacológica del meduloblastoma a ciclofosfamida. **Gaceta Mexicana de Oncología**. Vol. 14(1), p. 46–52, 2015.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. In Simpósio: **Fundamentos em Clínica Cirúrgica – 1ª parte capítulo II**. Vol. 41(3), p. 259-264. Ribeirão Preto, 2008.

TELES, K. A.; MEDEIROS-SOUZA, P.; LIMA, F. A. C.; ARAUJO, B. G.; LIMA, R. A. C. Cyclophosphamide administration routine in autoimmune rheumatic diseases: a review. **Revista Brasileira de Reumatologia**. Vol. 57, nº 6, p. 596–604, 2017.

TICE, R. R.; AGURELL. E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Vol. 35, p. 206-211, 2010.

TOHAMY, A. A.; ABDELLA, E. M.; AHMED, R. R.; AHMED, Y. K. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. **Cytotechnology**. Vol. 66, p. 283–297, 2014.

TORRES, F. G.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. P. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. **Journal of Functional Biomaterials**. Vol. 3, p. 864–878, 2012.

UNIMED. **Manual de prevenção e tratamento de lesões de pele**. Paraná. 2016.

UNNITHAN, A. R.; N. BARAKAT, A. M.; PICHIAH, P. B. T.; GNANASEKARAN, G.; NIRMALA, R.; CHA, Y. S.; JUNG, C. H.; EL-NEWEHY, M.; KIM, H. Y. Wound-dressing

materials with antibacterial activity from electrospun polyurethane–dextran nanofiber mats containing ciprofloxacin HCl. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 90, p. 1786–1793, 2012.

URBINA, G.; RIDER, J. Manejo de heridas complejas con sustitutos dérmicos. **Revista Chilena de Cirugía**. Vol. 68(3), p. 245---249, 2016.

VASCONCELOS, A.; CAVACO-PAULO, A. Wound dressings for a proteolytic-rich environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 90, p. 445–460, 2011. DOI 10.1007/s00253-011-3135-4

VICENTE, S. J. V., ISHIMOTO, E. Y., CRUZ, R. J., PEREIRA, C. D. S., TORRES, E. A. F. S. Increase of the Activity of Phase II Antioxidant Enzymes in Rats after a Single Dose of Coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, p. 10887-10892, 2011.

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; MANCINI-FILHO, J.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Vol. 33(3), 2011.

WANG, J.; FANG, X.; GE, L.; CAO, F.; ZHAO, L.; WANG, Z.; XIAO, W. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. **Plos One**. Vol. 13(5), 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0197563.

WANG, X.; LI, Q.; HU, X.; MA, L.; YOU, C.; ZHENG, Y.; SUN, H.; HAN, C.; GAO, C. Fabrication and characterization of poly(L- lactide-co-glycolide) knitted mesh-reinforced collagen-chitosan hybrid scaffolds for dermal tissue engineering. **Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. Vol. 8, p. 204–215, 2012.

WANG, X.; WU, P.; HU, X.; YOU, C.; GUO, R.; SHI, H.; GUO, S.; ZHOU, H.; YU, C.; ZHANG, Y.; HAN, C. Polyurethane membrane/knitted mesh-reinforced collagen–chitosan bilayer dermal substitute for the repair of full-thickness skin defects via a two-step procedure. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. Vol. 56, p. 120 – 133, 2016.

WOLF, K. L. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de biofilmes elaborados a partir defibra e pó de colágeno**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto, 2007.

XU, X.; SUN, L.; DONG, J.; ZHANG, H. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with superficial carbon oxide. **Innovative Food Scienceand Emerging Technologies**. Vol. 10, p. 42-46, 2009.

YAMANO, S.; HAKU, K.; YAMANAKA, T.; DAÍ, J.; TAKAYAMA, T.; SHOHARA, R.; TACHI, K.; ISHOKA, M.; HANATANI, S.; KARUNAGARAN, S.; WADA, K.; MOURSI, A. M. The effect of a bioactive collagen membrane releasing PDGF or GDF-5 on bone regeneration. **Biomaterials**. Vol. 35, p. 2446-2453, 2014.

YAMATOOGI, R.S.; RAHAL, S.C.; GRANJEIRO, J.M.; TAGA, R.; CESTARI, T.M.; LIM, A.F.M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural**. Vol. 35, nº 4, p. 837-842, 2005.

YILMAZ, U. C.; BAGCA, B. G.; KARACA, E.; DURMAZ, A.; DURMAZ, B.; AYKUT, A.; KAYALAR, H.; AVCI, C. B.; SUSLUER, S. Y.; GUNDUZ, C.; COGULU, O.. Evaluation of the miRNA profiling and effectiveness of the propolis on B-cell acute lymphoblastic leukemia cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Vol. 84, p. 1266–1273, 2016.

ZAO, X.; LIU, Y.; LI, W.; LONG, K.; WANG, L.; LIU, S.; WANG, Y.; REN, L. Collagen based film with well epithelial and stromal regeneration as corneal repairmaterials: Improving mechanical property by crosslinking with citric acid. **Materials Science and Engineering C**. Vol. 55, p. 201–208, 2015.

ZHANG, J.; YANG, S.; LI, H.; CHEN, F.; SHI, J. Naringin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting NADPH oxidase 4. **European Journal of Pharmacology**. Vol. 804, p. 1–6, 2017.

ZHANG, H.; WANG, X.; WANG, K.; LI, C. Antioxidant and tyrosinase inhibitory properties of aqueous ethanol extracts from monofloral bee pollen. **Journal of Apicultural Science**. Vol. 59(1), p. 1-10, 2015. DOI: 10.1515/JAS-2015-0013.

ZHANG, T.; LIANG, J.; WANG, P.; XU, Y.; WANG, Y.; WEI, X.; FAN, M. Purification and characterization of a novel phloretin-2'-*O*-glycosyltransferase favoring phloridzin biosynthesis. **Scientific Reports**. Vol. 6: 35274, 2016. DOI: 10.1038/srep35274.

ZHAO, Y.; LI, X.; ZENG, X.; HUANG, S.; HOU, S.; LAI, X. Characterization of phenolic constituents in *Lithocarpus polystachyus*. **Analitical Methods**. Vol. 6, p. 1359-1363, 2014. DOI: 10.1039/c3ay41288a

ZIMMERMANN, M.; RAISER, A. G.; BARBOSA, A. L. T.; NOVOSAD, D.; STEFFEN, R. P. B.; LUKARSEWSK, R.; SILVA, M. S.; LINDINGER, R.; PASTORE JÚNIOR, F. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.6, p.1719-1723, nov-dez, 2007.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZULUAGA,C.; MARTÍNEZ, A.; FERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ-BALDÓ, J.; QUILES, A.; RODRIGO, D. Effect of high pressure processing on carotenoid and phenolic compounds, antioxidant capacity, and microbial counts of bee-pollen paste and bee-pollen-based beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Vol. 37, p. 10–17, 2016.

## ANEXOS

### ANEXO I – Termo de aprovação do projeto no Comitê de Ética – UESPI



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



#### DECLARAÇÃO CEUA-UESPI

Declaro que, o pesquisador, GERALDO EDURADO LUZ JUNIOR, deu entrada sob no protocolo o Nº 15486/2015 do Projeto intitulado APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DAS PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DO NPÓLEN APÍCOLA.

O mesmo após a análise da Comissão teve o seguinte parecer:

**APROVADO**

Data do relatório final: 2018.2

Teresina, 27 de outubro de 2015.

Coordenador da Comissão

CEUA

Dr. ARNESTO LUZ MARTINS Maia Filho  
Coordenador CEUA UESPI  
Port. Nº 1347

## ANEXO II – Termo de cadastro na plataforma SisGen



**Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº A35856E**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A35856E**  
Usuário: **Geraldo Eduardo da Luz Júnior**  
CPF/CNPJ: **756.483.183-91**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

### **Espécie**

**Impossibilidade de identificação**

Título da Atividade: **DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL COM PÓLEN APÍCOLA PARA AUXILIAR NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTANEA**

### **Equipe**

<b>Geraldo Eduardo da Luz Júnior</b>	<b>Universidade Estadual do Piauí</b>
<b>Afra Maria do Carmo Bandeira do Nascimento</b>	<b>Universidade Federal do Piauí</b>

Data do Cadastro: **13/06/2018 12:24:05**  
Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 12:34 de 13/06/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO III – Solicitação de depósito da patente junto ao NINTEC – UFPI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ  
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA  
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10  
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

**DECLARAÇÃO**

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de AFRA MARIA DO CARMO BANDEIRA DO NASCIMENTO- DOUTORANDA , que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 21/06/2018, cujo título denomina-se **“DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL COM PÓLEN APÍCOLA PARA AUXILIAR NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTANEA ”**, do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 21/06/2018.

Prof.ª Dr.ª Maria Rita de Moraes Chaves Santos  
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

## APENDICES

### APENDICE I – Curvas de calibração dos testes de bioativos

Figura A: Curva de calibração de ácido gálico (5-240  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) a 720 nm

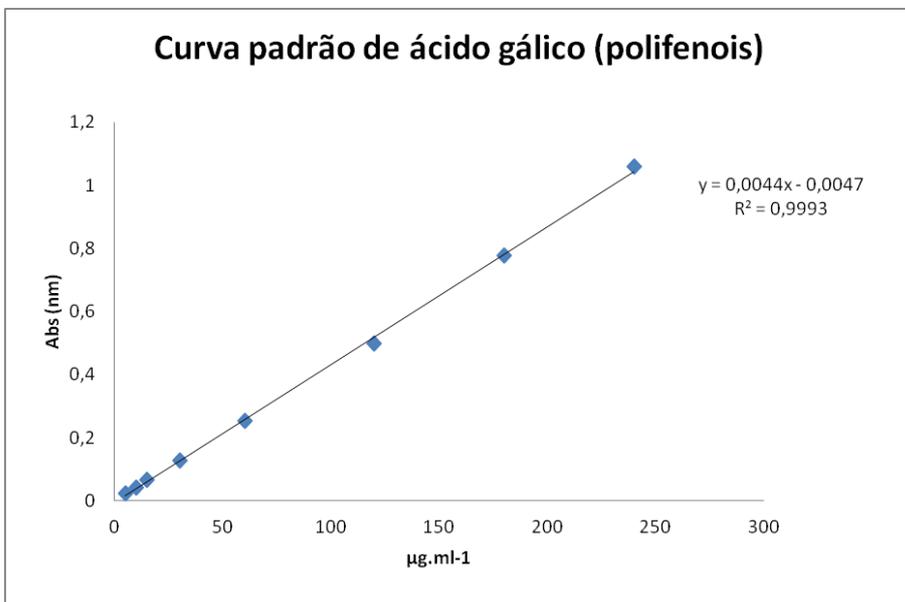


Figura B: Curva de calibração de catequina a 510 nm

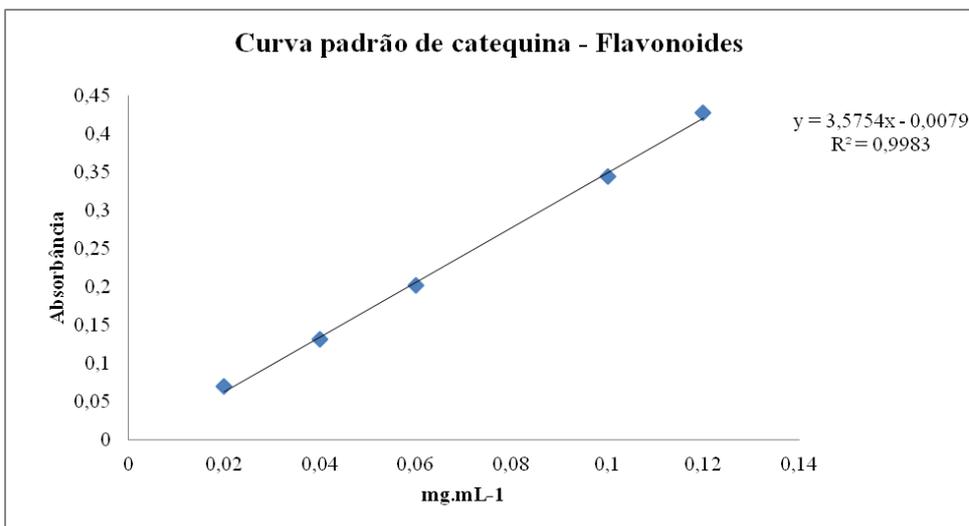


Figura C: Curva de calibração com padrão de trolox para ABTS a 734 nm

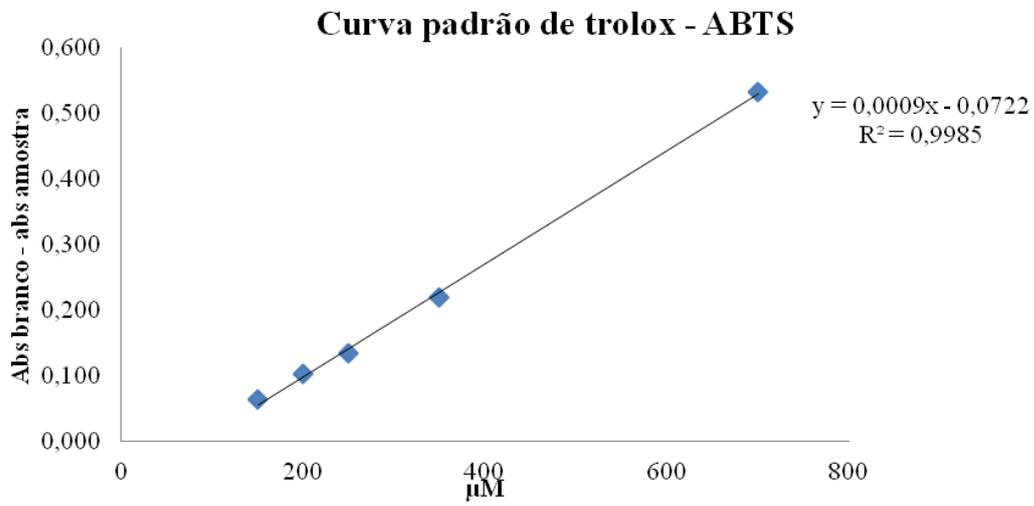
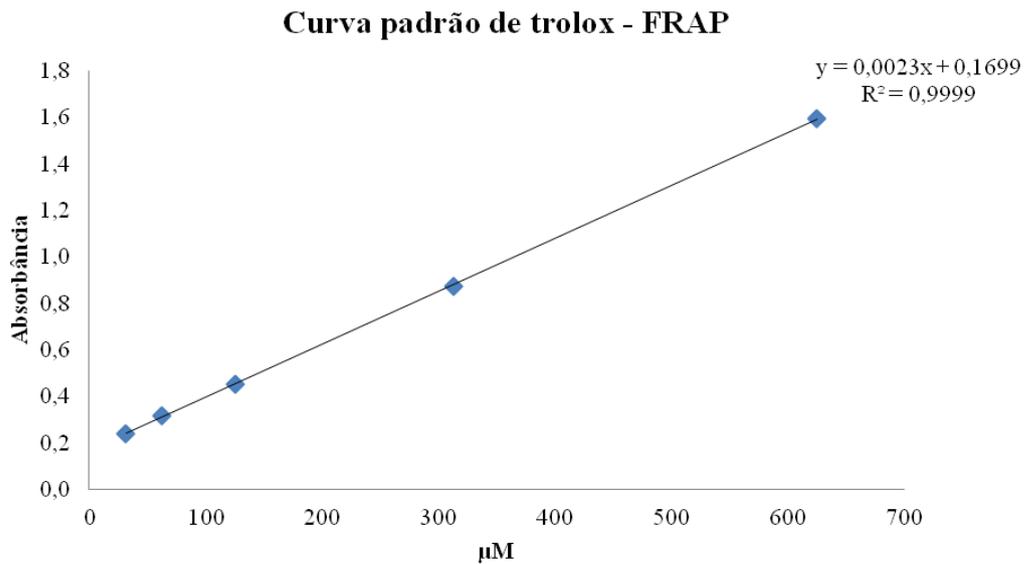
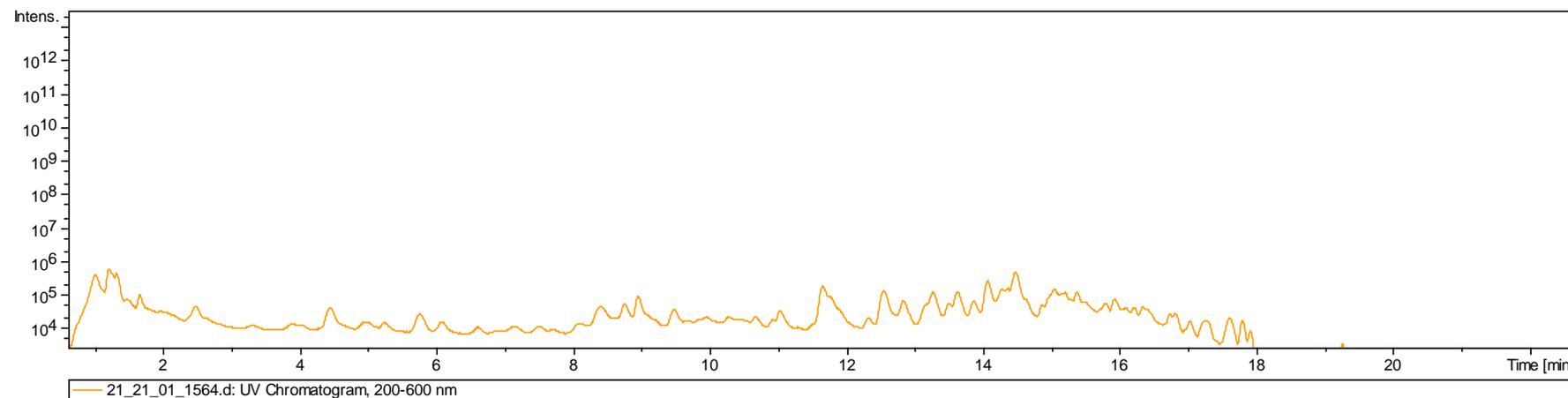


Figura D: Curva de calibração com padrão de trolox para FRAP a 620 nm



APENDICE II – Cromatograma CLAE-DAD/EM-ESI 200-600 nm do extrato etanólico de pólen apícola



APENDICE III - Compostos fenólicos identificados no extrato etanólico de pólen apícola da região norte do Piauí por CLAE-DAD/EM-ESI (tempo de retenção, *m/z*)

T <sub>r</sub>	MS	MS <sub>2</sub>	MS <sub>3</sub>	ID	Fonte
1,4	305	177, 125		Epigallocatequina ou galatocatequina	Hofmann, Nebehaj, Albert, 2016
1,5	191	111, 173	111	Ácido quínico	Simirgiotis et al., 2015
1,6	195	128, 176	128, 178	Ácido galactônico	Goger et al., 2015
5,2	335	317, 291, 249	249, 231, 179	Ácido cafeoilchiquimico	Habib et al., 2014
8,8	353	353, 191, 179	191, 173, 109	Ácido clorogênico (isômero)	Hofmann, Nebehaj, Albert, 2016
9,1	273	273, 193, 111	191, 122	Floretina	Zhao et al., 2014
11,7	625	625, 463, 301	463, 344, 301, 257, 179	Quercetina-3-O-glicosídeo	Barros et al., 2013
11,8	625	301, 463	300, 179	Quercetina 3,7-di-O-hexosídeo	Karar e Kuhnert, 2015
12,8	436	436, 316	316, 273, 145	Floretina hexosídeo	Bystrom et al., 2008
13,2	609	301	301	Quercetina rutinosídeo (isômero)	De-Melo et al., 2018
13,4	194	195, 176, 149, 132	176, 162, 132, 119	Ácido ferúlico	De-Melo et al., 2018
13,4	195	195, 177, 149	177, 133, 119	Ácido galactônico	Goger et al., 2015
13,4	609	609, 490, 429, 285	429, 369, 339	Luteolina-6,8-di-C-glicosídeo	Brito et al., 2014
13,6	639	459, 315	315, 300	Isoramnetina-3-O-diglicosídeo	De-Melo et al., 2018
14,0	623	608, 444, 381, 314, 298, 270	314, 298, 271, 255, 242, 228	Isoramnetina-3-O-rutinosídeo (isômero)	Li et al., 2016; De-Melo et al., 2018
14,3	463	301	301	Quercetina-3-O-	Simirgiotis et al.,

				glicosídeo	2015
14,3	593	473, 429, 284	428, 309, 284	Luteolina-4-O- ramnosídeo(1- 2)glicosídeo	Zhao et al., 2013
14,9	623	608, 464, 459, 357, 315, 300, 270, 254, 227	315, 298, 285, 256, 241	Isoraminetina-3-O- rutinosídeo (isômero)	Li et al., 2016
15,0	593	592, 327, 285, 229, 186	285, 256, 241	Caempferol-3-O- glucosídeo-7- ramnosídeo	Ibrahim et al., 2015
15,4	447	447, 327, 285, 269, 255	286, 285, 284, 256, 255, 254	Luteolina-7-O- glicosídeo	Chen et al., 2016
15,5	477	315, 300	315, 300	isoramnetina-3-O- glucosídeo	Brito et al., 2014 De-Melo et al., 2018
15,8	563	520, 519	521, 315, 299, 271, 254	Derivado de raminetina- 3-O-(6-O- acetilglucosídeo)	Negri, Tabach, 2013
16,0	533	533, 490, 489	489, 285, 284	Caempferol-3-O- malonilglucosídeo	Kajdzanoska, Gjamovski, Stefova, 2010
16,0	489	489, 327, 285, 257	285, 266, 257, 229,213, 197	Caempferol-3-O- acetilglucosídeo	Kajdzanoska, Gjamovski, Stefova, 2010
18,8	327	327, 309, 291, 273, 238, 229, 221, 211, 193, 183, 171, 165, 155	229, 227, 210, 209, 183, 167, 127	Ácido oxo-dihidroxi- octadecenoico (isômero)	Agalar et al., 2018
19,3	580	579, 565, 516, 472, 459, 415, 310, 271	565, 548, 499, 471, 432, 415, 342, 270	Naringina	Ibrahim et al., 2015

APENDICE IV – Trabalho apresentado em 2018



## Bee pollen properties: uses and potential pharmacological applications-a review

### Abstract

Bee pollen is a food supplement widely used in the world due to the benefits promoted by the bioactive compounds present in it. In addition to the very attractive nutritional composition, the presence of phenolics, flavonoids, terpenes are responsible for the antioxidant activity, antimicrobial, antiinflammatory, possible action on benign prostatic hyperplasia, no cytotoxic. It is intended to show with this article the uses and potential of bee pollen application. Numerous studies are aimed at identifying these compounds in pollen samples around the world, because according to the region, climatic type, seasons, shift and bee species, the composition is influenced by the variety. The use of pollen is more recurrent in the food industry are comprehensively summarized in this review, but the biomedical could also take advantage of the potential that this product demonstrates.

**Keywords:** bee products, bioactive compounds, antioxidant activity, pharmacological uses

Volume 7 Issue 5 - 2018

Afra M C B Nascimento,<sup>1</sup> Geraldo E Luz Jr<sup>2</sup>

<sup>1</sup>RENORBIO, Federal University of Piauí, Brazil

<sup>2</sup>Department of Chemistry, State University of Piauí, Brazil

**Correspondence:** Geraldo E Luz, Department of Chemistry, State University of Piauí, Rua João Cabral, S/N, Pirajá, Teresina-PI, Brazil Tel +55 86 321 37942, Email geraldoeduardo@gmail.com

**Received:** June 06, 2018 | **Published:** September 04, 2018

### Introduction

Foods are natural source of several health promoting substances with significant biological activities.<sup>1</sup> Recently, dietary flavonoids are attracting increasing interest based on *in vitro* and *in vivo* studies suggesting a variety of beneficial biological properties.<sup>2</sup> The bee pollen is one of bee products that has highlighted due to the presence of bioactive compounds associated with health benefits.<sup>3</sup>

Bee pollen is a mixture of flower pollen, nectar and bee secretions. It can be collected by beekeepers without damage to the beehive. This natural product, that has been gaining prominence, is recognized to be a valuable apitherapeutic product with potential for medical and nutritional applications.<sup>4</sup> In fact it contains proteins, the 22 basic amino acids, carbohydrates, lipids, vitamins and minerals.<sup>5</sup>

The significant amount of phytosterols, carbohydrates, enzymes, nucleic and triterpene acids, vitamins and other biologically active substances in bee pollen provides anti-inflammatory, wound healing, cardiogenic, antiatherosclerotic and other pharmacological actions.<sup>6</sup> Thereby bee pollen is considered as “only perfectly complete food”.<sup>7</sup>

The most important bioactive substances in bee-pollen are phenolic compounds and carotenoids. Phenolic compounds are responsible for the color of the grain and its characteristic bitter taste.<sup>8</sup> Carotenoids are also important for color and for other biological functions, such as antioxidant activity, provitamin A activity, and enhancement of the immune system.

Nowadays, the major use of bee pollen is specialty food supplement but it has potential therapeutic benefits. Particularly, it has been used for a long time to manage benign prostatic hyperplasia (BPH) which is the most common disorder for older men,<sup>9</sup> how demonstrated by Park et al.,<sup>10</sup> that obtained satisfactory results using a herbal composition with bee pollen and *Panax ginseng* (ginseng) to the treatment of BPH. Therefore it is intended to show with this article the uses and potential of bee pollen application.

### Bioactive compound, antioxidant activity and others effects

The chemical composition of bee pollen is directly influenced by the botanical diversity from which it was collected, as shown by Modro et al.<sup>11</sup> In addition to the botanical contribution, storage time, nutritional status of the plant and environmental conditions in the phase of pollen collection by bees also influence the composition.<sup>3</sup> It should be noted that the action of a natural antioxidant depends on several factors, such as: reaction mechanism, experimental conditions and matrix heterogeneity.<sup>3</sup>

LeBlanc et al.,<sup>12</sup> identified *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric, vanillic, gallic and ferulic acids in bee pollen from the United States. Menezes maintains that among the carotenoids found in bee pollen,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene are predominant, and in a smaller amount cryptoxanthin, xanthophylls and flavoxanthin are predominant. It should be emphasized that the flavonoid and phenolic profile, both in quantity and variety, is directly related to the pollen types that make up the bee pollen.

Fanali, Dugo and Rocco<sup>4</sup> found nine polyphenols: *o*-, *p*-coumaric acid, ferulic acid, myricetin, cinnamic acid, quercetin, naringenin, hesperitin and kaempferol. All analytes, with the exception of *p*-coumaric acid and myricetin, which partially co-eluted with other pollen components, were also quantified in the sample. Lv et al.,<sup>14</sup> identified pollen samples from the Qinghai-Tibetan Plateau by HPLC-DAD-APCI/MS, quercetin and campherol, with no routine and isoramnetin being detected.

Six 4-desmethylsterols, one 4-monomethylsterol, four 4, 4-dimethylsterols and another three triterpene alcohols were reported for the first time in the bee pollen. Significant difference was found in the contents of free and esterified triterpene alcohols between bee-collected pollens from the selected plant origins. The total triterpene alcohol levels in bee pollen oil fractions have been found to vary between 2.6g/100g and 20.4g/100g oil. Triterpene alcohols in the bee pollen oils were dominated by steryl esters (>67%). Concurrently,

APENDICE VI – Artigo submetido à revista LWT – Food Science and Technology, qualis B1 em Biotecnologia.

Elsevier Editorial System(tm) for LWT - Food  
Science and Technology

Manuscript Draft

Manuscript Number: LWT-D-19-00835

Title: BEE POLLEN QUALITY PROFILE FROM NORTH REGION OF PIAUÍ - BRAZIL

Article Type: Research paper

Keywords: bee products; chemical composition; botanical origin; microorganisms; food safety.

Corresponding Author: Professor Afra Maria do Carmo Bandeira Nascimento, M.D.

Corresponding Author's Institution: Instituto Federal do Piauí

First Author: Afra Maria do Carmo Bandeira Nascimento, M.D.

Order of Authors: Afra Maria do Carmo Bandeira Nascimento, M.D.; Maria do Carmo P Rodrigues, Dr.; Geraldo E Luz Jr, Dr.; Mariana M Sousa, Dr.; Claudia I Silva, Dr.; Ticiane C Oliveira, MD

Abstract: Bee pollen is a product of the agglutination of flower pollen with saliva of worker bees. Its composition varies according to the botanical origin, both between different regions and in the same regions. The study was objective to verify the botanical, chemical and microbiological profile of bee pollen from the only production center in the state of Piauí. Tests of botanical origin, centesimal and microbiological composition were performed on bee pollen produced in Piauí. The botanical profile indicated predominance of pollen type *Mimosa caesalpinifolia*, a plant native to the region. The physicochemical analyzes were satisfactory. The results were within the established limits, except the humidity, however the water activity was less than enough to avoid changes in the product. The result of the microbiological analysis is the ensure of the safe consumption of these products. In addition, this result informs about the handling conditions of the establishment, since the pollen cannot be heated. Therefore, the bee pollen analyzed complies with Brazilian quality standards.

Suggested Reviewers: Mirjana B Pesic PhD  
Department of Chemistry and Biochemistry, University of Belgrade  
mpesic@agrif.bg.ac.rs  
She has research to evaluate the physico-chemical composition of bee pollen, which would favor the understanding of my work.

F.Bedia Erim  
Department of Chemistry, Istanbul Technical University  
erim@itu.edu.tr  
She has research of bee pollen characterization, which would favor the understanding of my work.

Antonio Felicioli  
University of Pisa  
antonio.felicioli@unipi.it