

**DANILLO DANIEL VILELA**

**HIDROGEL DE CARBOXIMETILCELULOSE DE  
SÓDIO E PRÓPOLIS: DESENVOLVIMENTO E  
CARACTERIZAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia  
Orientadora: Prof. Dra. Ana Maria Minarell Gaspar

**São Carlos  
2010**



Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia  
EESC / FMRP / IQSC



DANILLO DANIEL VILELA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS  
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA EESC - FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 20/12/2010

PROFA. DRA. ANA MARIA MINARELLI  
GASPAR (ORIENTADORA)

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Resultado: APROVADO

Assinatura:

PROF. DR. YOUNES MESSADDEQ

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Resultado: Aprovado

Assinatura:

PROF. DR. TICIANA SIDCARENKO DE  
OLIVEIRA CAPOTE

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Resultado: Aprovado

Assinatura:

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar  
a vida com paixão, perder  
com classe e vencer com ousadia,  
pois o triunfo pertence a quem se atreve...  
A vida é muita para ser  
insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho a toda minha família, e principalmente a minha esposa, cuja gravidez me deu força para concluí-lo.

## **Agradecimentos**

Agradeço à professora Ana Maria Gaspar Minarelli, por toda a sua dedicação e principalmente por sua infinita paciência.

Aos professores Hernane da Silva Barud e Younes Messaddeq pela ajuda e confiança.

As Doutorandas Thaís de Cássia Negrini e Sybele Saska, pelos testes microbiológicos.

A acadêmica de Odontologia, Letícia B. Mestieri, e ao Acadêmico de Farmácia, Adalberto Miguel de Araújo Júnior pela cooperação neste trabalho.

## Resumo

VILELA,D.D. Hidrogel de carboximetilcelulose de sódio e própolis: Desenvolvimento e caracterização. 2010. 55f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, EESC/FMRP/IQSC,da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Estima-se que os EUA gastem por ano cerca de 100 milhões de dólares anuais para tratar e reabilitar pacientes com doenças na coluna vertebral. Aproximadamente 15% dos pacientes que são operados da coluna vertebral, não obtêm melhora clínica e irão necessitar de outros procedimentos cirúrgicos. Entre as principais causas de insucesso nos procedimentos cirúrgicos da coluna vertebral está a fibrose epidural, também chamada de peridural, e a utilização de um de material inibidor desta fibrose, nesse tipo de cirurgia, vem sendo pesquisada, mas até o momento não existe nenhum produto comercial, nacionalmente produzido, destinado à prevenção desta fibrose. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e caracterização químico-física e microbiológica de um hidrogel à base de Carboximetilcelulose de sódio (NaCMC) e própolis. Foram preparados 4 géis de NaCMC e própolis (1%, 2% e 8% e ausência de própolis) e caracterizados através da espectroscopia vibracional na região infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e também teste microbiológico. A espectroscopia vibracional da região do infravermelho identificou a formação de banda característica da ligação própolis com carboximetilcelulose de sódio. A estrutura microscópica manteve-se inalterada, mesmo na concentração de 8% de própolis. O gel de NaCMC própolis 8% demonstrou possuir excelente atividade antimicrobiana em relação aos demais géis e abre novas possibilidades de trabalhos futuros *in vivo* que poderão fornecer informações sobre a eficácia antiaderente e sua possível aplicação em procedimentos neurocirúrgicos.

Palavra-chave: Hidrogel, Carboximetilcelulose, Própolis

## **Abstract**

VILELA,D.D. Hydrogel carboxynethylcellulose of sodium and própolis: Development and characterization.2010. 55f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia, EESC/FMRP/IQSC,da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

It is estimated that the United States annually spend around 100 million dollars annually to treat and rehabilitate patients with spinal diseases. Approximately 15% of patients who are operated on the spine, does not obtain clinical improvement and will require other surgical procedures. Among the main causes of failure in surgical procedures of spinal epidural fibrosis is also called the epidural and the use of an inhibitor material of fibrosis in this type of surgery, has been researched, but so far there is no commercial product, nationally produced, for the prevention of fibrosis. The objective of this work was the development and characterization and chemical-physical microbiological analysis of a hydrogel made of NaCMC and propolis. Gels were prepared in four NaCMC and propolis (1%, 2% and 8% and the absence of propolis) and characterized by infrared vibrational spectroscopy, scanning electron microscopy and also microbiological testing. The vibrational spectroscopy identify the characteristic of propolis connection with carboxymethylcellulose. The structure microscopic remained unchanged, even at a concentration of 8% propolis. The NaCMC gel 8% propolis have demonstrated excellent antimicrobial activity compared to other gels and opens new possibilities for future work in vivo that might provide information on the effectiveness nonstick and its possible application to neurosurgical procedures.

Keyword: Hydrogel, Carboxymethylcellulose, Propolis

## Lista de Ilustrações

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>Figura 1</b>  | <b>Estrutura molecular da carboximetilcelulose de sódio .....</b>                                  | <b>15</b> |
| <b>Figura 2</b>  | <b>Disposição das hidroxilas presentes no anel de glicopirranose.....</b>                          | <b>18</b> |
| <b>Figura 3</b>  | <b>(a) unidade de repetição da celulose (b) unidade de repetição de derivados da celulose.....</b> | <b>19</b> |
| <b>Figura 4</b>  | <b>Estrutura molecular da NaCMC com grau de substituição x.....</b>                                | <b>21</b> |
| <b>Figura 5</b>  | <b>Estrutura química dos flavonóides .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>Figura 6</b>  | <b>Esquemática da placa de cultura no ensaio microbiológico .....</b>                              | <b>39</b> |
| <b>Figura 7</b>  | <b>Aspecto macroscópico dos hidrogéis após o preparo .....</b>                                     | <b>40</b> |
| <b>Figura 8</b>  | <b>FT-IR de amostras dos géis liofilizados .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>Figura 9</b>  | <b>(a) e (b)Imagem do MEV do hidrogel de NaCMC puro .....</b>                                      | <b>43</b> |
| <b>Figura 10</b> | <b>(a) e (b)Imagem do MEV do hidrogel de NaCMC e própolis 8% .....</b>                             | <b>43</b> |
| <b>Figura 11</b> | <b>Imagem dos halos de inibição no ensaio microbiológico dos hidrogéis .....</b>                   | <b>45</b> |
| <b>Figura 12</b> | <b>Gráfico das médias dos halos de inibição dos hidrogéis no ensaio microbiológico .....</b>       | <b>45</b> |

## Lista de Tabelas

|                                       |   |           |
|---------------------------------------|---|-----------|
| <b>Tabela 1</b>                       | <b>Aplicações da celulose bacteriana .....</b>                  | <b>17</b> |
| <b>Tabela 2</b>                       | <b>Aplicações da NaCMC .....</b>                                | <b>23</b> |
| <b>Tabela 3</b>                       | <b>Massa e volume dos reagentes utilizados para preparo dos</b> |           |
| <b>hidrogéis</b>                      | <b>.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>Tabela 4</b>                       | <b>Valores dos Halos de Inibição dos hidrogéis</b>              |           |
| <b>no ensaio microbiológico .....</b> |   | <b>44</b> |



## **Lista de abreviaturas e siglas**

NaCMC – Carboximetilcelulose de sódio

TG - Termogravimetria

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

CB- Celulose Bacteriana

HPC- Hidroxipropilcelulose

MC- Metilcelulose

HPMC- Hidroxipropilmetilcelulose

EC- Etilcelulose

HEC-Hidroxietilcelulose

CMC- Carboximetilcelulose

FT-IR- Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho

EPP-AF- Extrato Padronizado de Própolis-Ápis Flora

# SUMÁRIO

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 1       | Introdução .....                            | 12 |
| 2       | Objetivo .....                              | 14 |
| 3       | Introdução Teórica .....                    | 15 |
| 3-1     | Celulose.....                               | 15 |
| 3-2     | Derivados da Celulose.....                  | 18 |
| 3-3     | Carboximetilcelulose de sódio ( NaCMC)..... | 20 |
| 3-4     | Própolis.....                               | 12 |
| 3-4-1   | Propriedades Biológicas da Própolis .....   | 26 |
| 3-4-1-1 | Propriedade Antimicrobiana .....            | 26 |
| 3-4-1-2 | Propriedade Antiinflamatória .....          | 27 |
| 3-4-1-3 | Propriedade Antioxidante.....               | 27 |
| 3-4-1-4 | Propriedade Antiviral.....                  | 28 |
| 3-4-1-5 | Propriedade Cicatrizante.....               | 28 |
| 3-4-1-6 | Propriedade Imunomodulatória.....           | 28 |
| 3-4-1-7 | Outras Propriedades da Própolis .....       | 19 |
| 3-5     | Hidrogel.....                               | 30 |
| 4       | Material e Método.....                      | 32 |
| 4-1     | Preparo dos Hidrogéis .....                 | 32 |
| 4-2     | Métodos de Caracterização.....              | 33 |
| 4-2-1   | Caracterização Estrutural .....             | 33 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4-2-1-1 | Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho(FT-IR)..... | 34 |
| 4-2-2   | Caracterização Morfológica .....                                  | 35 |
| 4-2-2-1 | Microscopia Eletronica de Varredura(MEV).....                     | 35 |
| 4-2-3   | Ensaio Antimicrobiano .....                                       | 36 |
| 5       | Resultados e Discussão.....                                       | 40 |
| 5-1     | Aspecto dos Hidrogéis.....  | 40 |
| 5-2     | Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho .....       | 40 |
| 5-3     | Microscopia Eletronica de Varredura.....                          | 42 |
| 5-4     | caracterização Microbiológico.....                                | 44 |
| 6       | Conclusões .....  | 47 |
| 7       | Referência Bibliográfica .....                                    | 48 |

## 1-Introdução

Atualmente hidrogéis ocupam posição de destaque em biotecnologia, em função de suas aplicações. Em geral, hidrogéis são bio compatíveis e podem ser aplicados para liberação controlada de medicamentos, implantes terapêuticos, cultura de células etc.

Tecnicamente, hidrogel é um material constituído de redes poliméricas tridimensionais hidrofílicas com habilidade de absorver e reter grande quantidade de água. A água e os poros no interior do hidrogel permitem a difusão seletiva de solutos através da membrana.

A carboximetilcelulose de sódio é um polímero aniônico derivado da celulose, com excelente inércia fisiológica e capacidade de formação de hidrogel, apresentando grande potencial para a aplicação na área médica (SANINO, DEMITRI, MADAGHIELE, 2009). Na área médica, especificamente na cirurgia neurológica, um hidrogel a base de carboximetilcelulose e óxido de polietileno (RODGERS et al., 2003) vem sendo utilizado com objetivo de evitar a formação de fibrose epidural, que é a deposição de tecido fibroso no espaço epidural. Esse processo é, usualmente, causado pela manipulação prévia desse espaço por meio da colocação de cateteres epidurais ou, mais frequentemente, por cirurgias de coluna vertebral que envolva a exploração do espaço epidural (SCHOFFERMAN; REYNOLDS; HERZOG, 2003).

Sabe-se que a fibrose epidural está entre as principais causas de insucesso nos procedimentos cirúrgicos da coluna vertebral (SCHOFFERMAN; REYNOLDS; HERZOG, 2003).

Outra causa de insucesso nos procedimentos cirúrgicos da coluna vertebral, são os processos infecciosos (COLLINS et al., 2008). A incidência desta complicação pode atingir 11,6%, sendo que o microorganismo *Staphiloccocus sp*, está envolvido em mais de 90% dos casos (FALAVIGNA et al., 2006).

Nenhum material utilizado em procedimentos cirúrgicos para prevenção da fibrose peridural apresenta efeitos antimicrobianos, inclusive o hidrogel de carboximetilcelulose e óxido de polietileno descrito por RODGERS et al. (2003).

Desta maneira, propõe-se o desenvolvimento do hidrogel associando a carboximetilcelulose de sódio com a própolis, pois esta substância apresenta efeitos antibacterianos conhecidos, especialmente em bactérias gram positivas (SCAZZOCCHIO et al., 2005). Também é importante ressaltar que a própolis brasileira é uma referência científica internacional, devido à sua elevada variedade de princípios, entre eles a presença de ácidos fenólicos e flavonóides, aos quais são atribuídos os principais efeitos farmacológicos (SIMÕES et al., 2004).

É importante mencionar também que não há produtos nacionais destinados a evitar a fibrose epidural, sendo que o custo de hidrogéis antifibróticos importados inviabiliza o uso rotineiro na prática clínica. Assim, o desenvolvimento deste tipo de hidrogel, associado aos benefícios antimicrobianos, poderia contribuir para a melhoria de saúde em nosso país.

## **2 - Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de hidrogel a base de carboximetilcelulose de sódio (NaCMC) e própolis, assim como, a caracterização químico-física e microbiológica.

### 3 - Revisão Bibliográfica

#### 3-1- Celulose

A celulose é o polímero natural mais abundante na Terra, sendo o componente presente em maior quantidade na biomassa das plantas (BARUD, 2006).

A celulose é um homopolissacarídeo linear cuja estrutura é constituída por unidades de  $\beta$ -D-glicopiranosose ( $\beta$ -glucose) unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (SANINO et al., 2009), como demonstrado na figura 1.

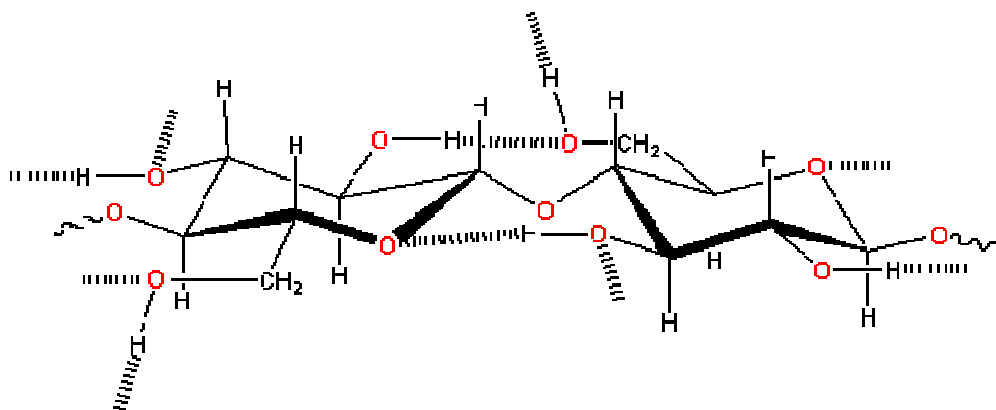


Figura 1 – Estrutura linear de celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis (SANINO et al., 2009).

As ligações de hidrogênio intermoleculares existentes na estrutura da celulose são responsáveis pela formação de fibras de celulose e as ligações intramoleculares conferem a rigidez da cadeia; apresenta cristalinidade (normalmente entre 40-60%), biodegradável, não tóxica, não alergênica (BARUD, 2006).

A celulose tem grande importância na economia global e isso lhe confere as várias aplicações industriais, tais como a produção de papel, na indústria madeireira, como emulsificador, agente dispersante, agente gelificante, entre outras.

A principal fonte industrial de celulose é a madeira de eucalipto que é composta por celulose (40 a 45%), lignina (25 a 30%), hemiceluloses (30%) e extrativos (até 4%), não sendo obtida quimicamente pura; este polímero pode ser obtido por diversas fontes, tais como plantas, por síntese enzimática, por síntese química, além de ser excretada durante o metabolismo de alguns microorganismos, dentre eles os gêneros *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Acetobacter*, este último em especial caracterizado pela bactéria *Acetobacter xylinum*, capaz de sintetizar celulose em quantidades comerciais (BARUD, 2006).

A estrutura física da biocelulose é semelhante à da celulose produzida pelas plantas. Entretanto a celulose bacteriana (CB) é obtida pura quimicamente, ou seja, sem conter em sua composição lignina e hemicelulose, presente na celulose das plantas (SANINO et al., 2009). A celulose bacteriana apresenta cadeias nanométricas (“nanocelulose”), organizadas em um arranjo estrutural tridimensional, constituído por um sistema altamente cristalino (60 – 80%) com excelente força mecânica (STEINBUCHEL; MARCHESSAULT, 2005).

Essa morfologia nanométrica fornece à celulose bacteriana propriedades como grande área superficial, pureza, uniformidade, altamente nanoporosa, alta cristalinidade (acima de 60%), capacidade de absorção e retenção de água, boa elasticidade, boa resistência à tração, além de ser facilmente moldável, biodegradável, biocompatível, não tóxica e não alergênica (STEINBUCHEL; MARCHESSAULT, 2005).

A aplicação da celulose bacteriana é bastante variada, estando presente em diversas áreas, tais como demonstrado na tabela 1, segundo STEINBUCHEL, MARCHESSAULT( 2005):



Tabela 1- Aplicações da celulose bacteriana (Steinbuchel, Marchessault, 2005)

| Área                   | Aplicação  |
|------------------------|--|
| Indústria Têxtil       | Roupas para esportes, tendas de camping                            |
| Indústria Alimentícia  | Celulose comestível “nata de coco”                                 |
| Cosméticos             | Crems tônicos, condicionadores,<br>polidores de unhas              |
| Medicina               | Pele artificial para queimaduras e úlceras,<br>implantes dentários |
| Eletrônica             | Materiais óptico-eletrônicos (tela de<br>cristal líquido)          |
| Purificação de esgotos | Ultrafiltração de água   |
| Tratamento de lixo     | Reciclagem de minerais e óleos                                     |
| Indústria de Papel     | Substituição da madeira e fabricação de<br>papéis especiais        |

### 3-2- Derivados da Celulose

Devido à presença de ligações de hidrogênio, a celulose vegetal não é solúvel em água e em vários solventes convencionais, sendo um fator limitante para algumas aplicações. O desenvolvimento dos derivados da celulose envolve a introdução de diversos grupos funcionais tais como éteres e ésteres na cadeia da celulose, sendo isto possível devido à reatividade dos grupos OH presentes em sua estrutura química.

São exemplos de derivados da celulose: carboximetilcelulose de sódio (NaCMC.), estudado durante este trabalho para o preparo dos hidrogéis, hidroxipropilcelulose (HPC), acetato de celulose, acetato butirato de celulose, entre outros (BARUD, 2006).

Segundo Barud (2006), o grupo (C1-OH) é redutor, pois é formado por ligação hemiacetal intramolecular, enquanto o grupo (C4-OH) é um grupo alcoólico não redutor. A hidroxila (C6-OH) é a mais reativa, seguida pela hidroxila ligada ao carbono 2 (C2-OH). Como a hidroxila ligada ao carbono 3 (C3-OH) está fortemente mais envolvida em ligações de hidrogênio sua reatividade é inferior aos demais carbonos. A figura 2 relata a disposição das hidroxilas presentes no anel de glicopirranose.

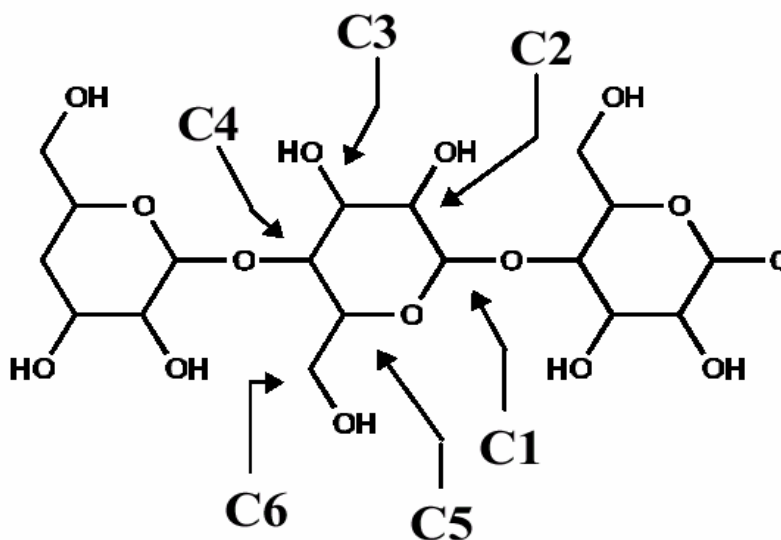


Figura 2 - Disposição das hidroxilas presentes no anel de glicopirranose (REGIANI, 2000)

Os grupos funcionais presentes na celulose e as interações físicas entre as cadeias são os dois fatores importantes em casos de derivação. A reação de grupos hidroxila presentes na celulose com grupos orgânicos, como metila e etila determina o tipo de derivado (Figura 3).

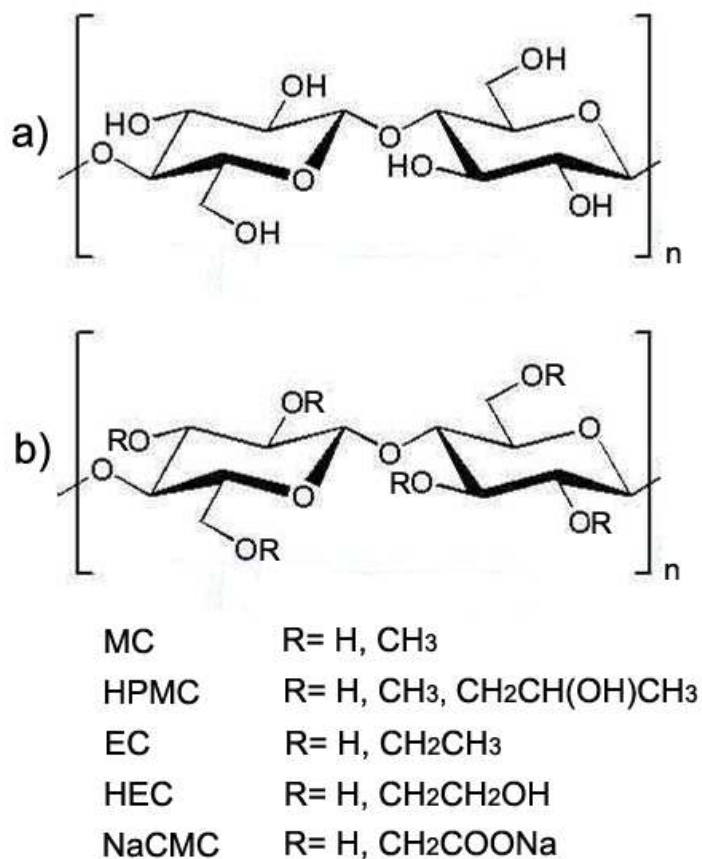


Figura 3 - (a) (uma unidade de repetição) de celulose, também denominado (celubiose unitário); (b) repetição de derivados da celulose. O grupo substituinte R é indicado para metilcelulose (MC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), etilcelulose (EC), hidroxietilcelulose (HEC) e carboximetilcelulose de sódio (NaCMC), (SANINO et al, 2009).

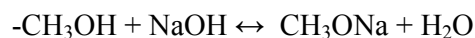
### 3-3- Carboximetilcelulose de sódio (NaCMC)

A carboximetilcelulose de sódio (NaCMC) é um polímero sintético, aniônico derivado da celulose, muito solúvel em água, tanto a frio quanto a quente, na forma tanto de solução propriamente dita quanto gel. Apresenta sensibilidade às variações de pH e força iônica, sendo o único polieletrólito derivado da celulose com esta característica (SANINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009 ).

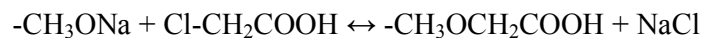
Sua coloração varia de branco a levemente creme, inodoro e pH entre 6,0 a 9,5 (para solução a 10%) (COVA, 2000).

Este polímero resulta do tratamento da celulose através de solução de hidróxido de sódio (NaOH) e monocloroacetato de sódio (CCH<sub>2</sub>-COONa), resultando na substituição parcial de grupos hidroxilas da glicose pelo grupo -CH<sub>2</sub>-COOH, atribuindo à tal celulose modificada qualidades de solubilidade e viscosidade em soluções desejadas, facilitando a hidratação da molécula (SU et al., 2009).

Pelo excesso de hidróxido de sódio, presente no processo, a ramificação do tipo metanol (-CH<sub>3</sub>OH) reage com a base formando metóxido de sódio (um éter) e água.



O éter formado anteriormente reage com o ácido monocloroacético formando metóxi de etila e cloreto de sódio.



Posteriormente, o metóxi de etila reage novamente com hidróxido de sódio formando o novo éter, que caracteriza a carboximetilcelulose (Figura 4 ).



Ao final do processo, as ramificações da celulose ( $-\text{CH}_3\text{OH}$ ) podem ser substituídas por ramificações do grupo carboximetil de sódio ( $-\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{COONa}$ ) diferenciando as propriedades entre elas.

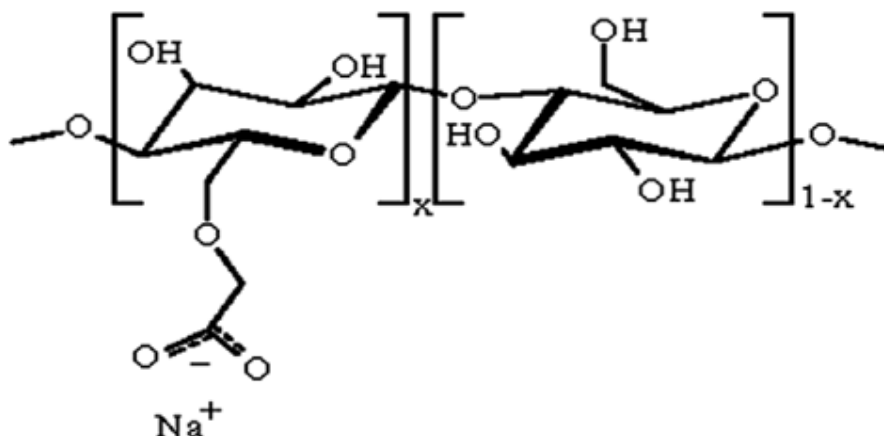


Figura 4 – Estrutura molecular da NaCMC com grau de substituição  $x$  (SU et al., 2009).

Estas reações químicas para a produção da carboximetilcelulose de sódio envolvem a chamada síntese de Williamson ou síntese de éteres de Williamson, que consiste na reação de obtenção de éteres por meio da substituição de halogênios por grupos negativos. A síntese ocorre entre haletos e alcóxidos de sódio ( $\text{R-O}^-\text{Na}^+$ ), (COVA, 2000).

Tanto éteres simétricos e assimétricos são facilmente preparados pela reação de Williamson, sendo, deste modo, largamente usado em laboratórios e indústrias. Esta reação também é freqüentemente utilizada para preparar um éter indiretamente de dois alcoóis.

A estrutura da NaCMC é baseada no polímero de celulose de B-(1->4)-D-glucopirranose. Diferentes preparações podem ter diferentes graus de substituição, referindo-se ao número de substituições que ocorre em seus radicais. O dito grau médio de substituição dos grupos hidroxilas na carboximetilcelulose situa-se acima de 0,5 e pode ir até 0,9 (SU et al., 2009).

As moléculas de NaCMC são normalmente mais curtas, em média, que as moléculas da celulose original da qual é produzida, apresentando áreas de maior e menor substituição. Esta substituição é predominantemente ligada em 2-O- e 6-O-, seguida por ordem de importância por ligações em 2,6-di-O- e 3-O-3,6-di-O-,2,3-di-O- por último 2,3,6-tri-O-. As moléculas de NaCMC são mais estendidas em ramificações a baixas concentrações, porém a altas concentrações as moléculas sobrepõem-se e ligam-se em espiraladas para formar um gel termoreversível (COVA, 2000).

O éter carboximetil de sódio confere algumas propriedades a NaCMC, tais como:

- solubilidade em água fria ou quente, quando ao presença de grupos carboxilatos com grau médio de substituição é maior do que 0,5 (COVA, 2000).
- insolúvel em álcool, éter e alguns solventes orgânicos (COVA, 2000).
- age como espessante, ligante, estabilizante, agente de suspensão, retentor de água, controlador de reologia (tixotropia, por exemplo) e meio suporte para imobilização de enzimas e/ou microrganismos (COVA, 2000).
- fisiologicamente inerte (SANINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009).
- biocompatibilidade (SANINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009).
- biodegradabilidade (SANINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009).

Na Tabela 2 estão exemplificados algumas aplicações da NaCMC segundo Kennedy (1985).

Tabela 2- Aplicações da NaCMC

| <b>Área</b>             | <b>Aplicação</b>  |
|-------------------------|---|
| Indústria Alimentícia   | Sorvetes, queijos, iogurtes, pó para refrescos, sobremesa cremosa, adoçante líquido, creme de leite, requeijão, entre outros. |
| Indústria Farmacêutica  | Encapsulação e liberação de princípios ativos.  |
| Indústria de Cosméticos | Agente floculante e emulsificante em géis, etc.   |
| Agrícola                | Agente de liberação de pesticidas e nutrientes.   |

### **3-4-Própolis**

A palavra própolis foi criada por Aristóteles, sendo derivada do grego *pro*, em defesa, e *polis*, cidade ou comunidade, isto é, em defesa da comunidade (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO, 2002). Escreve-se O ou A Própolis.

Os gregos chamavam própolis às portas de uma cidade, voz tomada pelo prefixo ‘pro’ e ‘polis’ (cidade). Mais tarde, Plínio empregou esta palavra em latim para dar nome à cera extraída da polpa das árvores com a qual as abelhas recobrem a entrada de suas colméias a fim de protegê-las contra fungos e bactérias (MARCUCCI, 1996).

Própolis é uma substância resinosa, com coloração variando de marrom a verde escuro, obtida pelas abelhas através da coleta de resinas da flora (pasto apícola) da região, e alteradas pela ação das enzimas contidas em sua saliva (MARCUCCI, 1996).

A própolis possui em sua composição 55% de resinas vegetais, 30% de cera de abelhas, 8 a 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, além de microelementos como alumínio,

cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (BURDOCK, 1998; PARK et al., 2002; MENEZES, 2005; FUNARI; FERRO, 2006).

A composição química da própolis está intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas (PARK et al., 2002) e com o período de coleta da resina (ROCHA et al., 2003). Além disso, a variabilidade genética das abelhas rainhas também influencia na composição química (PARK et al., 1998). Deste modo, um número significativo de trabalhos descrevendo a química da própolis foi publicado, mostrando que a composição é variável (MOREIRA, 1986; BANKOVA, 2005; SOUZA et al., 2007).

Entre os principais compostos ativos da própolis, podem-se citar os flavonóides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (ROCHA et al., 2003; OZKUL; SILICI; ERÖGLU, 2004; HAYACIBARA et al., 2005; HU et al., 2005).

De todos esses grupos de compostos, certamente o que vem chamando mais atenção dos pesquisadores é o dos flavonóides (LIMA, 2006). À eles, bem como aos ácidos fenólicos, são atribuídas algumas propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (HAYACIBARA et al., 2005; HU et al., 2005).

Flavonóides é o nome dado a um grande grupo de metabólicos da classe dos polifenóis, componentes de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies. São compostos tricíclicos contendo dois anéis aromáticos, os anéis A e B, e um anel, não aromático, contendo o grupamento pirona, anel C (CUSHNIE, LAMB, 2005) (Figura 5).



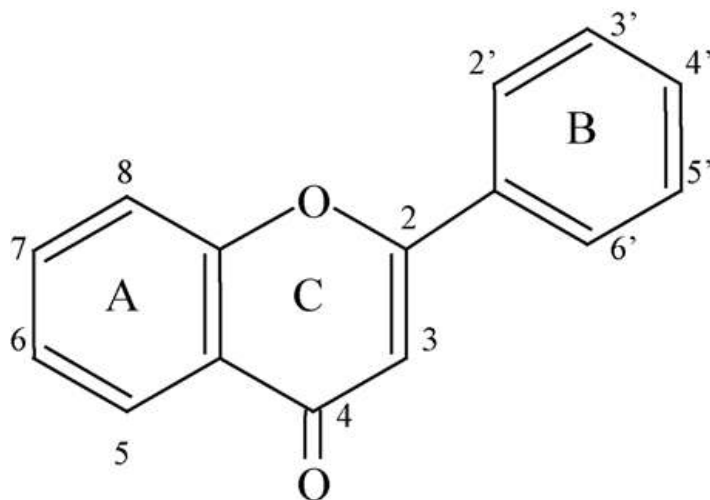


Figura 5 - Estrutura química dos flavonóides. Anéis aromáticos A e B, e anel contendo grupamento pirona, anel C (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Os diferentes tipos de flavonóides são encontrados em frutas, flores e vegetais em geral, assim como em alimentos processados como chá e vinho.

Mais de cinco mil compostos flavonóides foram descritos e classificados a partir de sua estrutura química, em especial com relação ao grau de oxidação do anel C.

São exemplos de flavonoides presentes na própolis: flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas, chalconas, diidroflavonóis.

A própolis verde do Brasil está associada à planta *Baccharis dracunculifolia*, conhecida também como alecrim-do-campo, de onde é nativo.

A própolis brasileira têm mostrado diferenças significantes na sua composição química em relação à própolis da zona temperada. Por essa razão, a própolis brasileira tem se tornado objeto de grande interesse por parte dos cientistas (TRUSHEVA et al., 2006).

A própolis verde brasileira, produzida em São Paulo e Minas Gerais, é constituída principalmente de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e possui grande quantidade de flavonóides, muitos dos quais não estão presentes em própolis da Europa, América do Norte e Ásia (SIMÕES et al., 2004).

Assim, a própolis brasileira tem sido uma referência internacional, não só para fins comerciais, mas também na área científica.

### **3-4-1- Propriedade Biológica da Própolis**

A própolis tem sido objeto de inúmeros estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral, imunomodulatória e outras (ALENCAR et al., 2005; BANKOVA, 2005; KORSALEK et al., 2005; SIMÕES; ARAUJO; ARAUJO, 2008).

Esse potencial biológico se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos dos constituintes presentes na própolis (MARCUCCI, 1996).

#### **3-4-1-1- Ação Antimicrobiana**

A atividade antibacteriana da própolis é atribuída principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletil do ácido caféico. Apresentam um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição da RNA-polimerase bacteriana (UZEL et al., 2005). Outros componentes como os flavonóides, ácido benzóico, ácido cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do microorganismo, causando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO et al., 2006).

A própolis possui atividade antibacteriana maior contra bactérias Gram-positivas e limitada contra Gram-negativas (MARCUCCI et al., 2001).

Testes *in vitro* demonstraram que a própolis apresenta, excelente atividade fungistática e fungicida contra leveduras apontadas como causadores de onicomicose (LONGHINI et al., 2007).

Diversos trabalhos relataram a atividade sinérgica da própolis associada a diversos antibióticos, inclusive contra cepas resistentes a benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina (SHUB et al., 1981). Existem evidências que apontam para uma ação sinérgica relevante, podendo se constituir como alternativa terapêutica para a resistência microbiana (STEPANOVIC et al., 2003; FERNANDES JR et al., 2005; ONLEN et al., 2007).

### **3-4-1-2-Ação Anti-inflamatória**

A presença de flavonóides, especialmente a galangina, parece estar envolvida na atividade antiinflamatória da própolis; este flavonóide apresenta atividade inibitória contra a ciclooxigenase (COX) e lipooxigenase. Tem sido relatado também que o ácido fenil éster caféico (CAPE), possui atividade antiinflamatória por inibir a liberação de ácido aracdônico da membrana celular, suprimindo as atividades das enzimas COX-1 e COX-2 (BORRELI et al., 2002).

A própolis tem demonstrado ação antiinflamatória também por inibir a síntese das prostaglandinas, ativar a glândula timo, auxiliando o sistema imune pela promoção da atividade fagocítica e estimulando a imunidade celular (KORSALEC et al., 2005).

### **3-4-1-3-Ação Antioxidante**

Os flavonóides são relatados como os mais abundantes e efetivos antioxidantes na própolis. Existe uma correlação entre o alto conteúdo de flavonóides totais e a atividade anti-radicais livres em extratos de própolis da Argentina (AHN et al., 2007).

A atividade antioxidante merece especial interesse, pois a própolis poderia ser aplicada topicamente com sucesso para prevenir e tratar a pele danificada (MARQUELE et al., 2006).

#### **3-4-1-4-Ação Antiviral**

Marcucci (1995) citou uma ação virucida da própolis no vírus do herpes simples (HSV) e da estomatite vesicular (VSV). Estudo comparando a eficácia de pomada de própolis canadense com pomadas de aciclovir e placebo (veículo) no tratamento de pacientes com herpes genital tipo 2 recorrente, mostrou a eficácia superior do preparado de própolis, na cicatrização das lesões e redução dos sintomas locais (VYNOGRAD; VYNOGRAD; SOSNOWSKI, 2000).

Estudos *in vitro* sugerem que a própolis tem uma potente atividade antiviral contra as variantes X4 e R5 do herpes vírus. Acredita-se que o mecanismo envolvido estaria relacionado à inibição da entrada viral pelos linfócitos CD4<sup>+</sup> (GEKKER et al., 2005).

#### **3-4-1-5-Ação Cicatrizante**

Acredita-se que a propriedade cicatrizante da própolis, esteja relacionada com flavonóides e ácidos fenólicos (ARVOUET-GRAND et al., 1994). Gregory et al. (2002), em estudos *in vivo*, mostraram que a propriedade cicatrizante de um creme de própolis foi superior à sulfadiazina de prata em pacientes vítimas de queimaduras de espessura parcial.

#### **3-4-1-6-Ação Imunomodulatória**

Estudos com ratos, demonstraram que o extrato de própolis atenuou o processo inflamatório nas via aéreas, provavelmente por sua habilidade em modular a produção de citocina (SY et al., 2006), desta forma, seria um novo agente no tratamento da asma.

Recentemente, muitos estudos têm demonstrado a atividade da própolis no sistema imunológico (ativando macrófagos, aumentando a atividade lítica contra células tumorais,

estimulando anticorpos, etc) como apresentado numa extensa revisão realizada por SFORCIN et al. (2000). Todavia os mecanismos envolvidos na quimioprevenção ainda não são completamente conhecidos.

Orsolich et al. (2004), através de modelos experimentais, demonstraram que derivados hidrossolúveis de própolis, ácido cafêico, éster feniletil do ácido cafêico e quercetina poderiam ser extremamente úteis no controle do crescimento tumoral.

### **3-4-1-7-Outras Propriedades da Própolis**

Há relatos de que a própolis baixe a pressão arterial e os níveis de colesterol no sangue (CAPASSO ; CASTALDO, 2002).

Como antiprotozoário, a própolis mostrou-se ativa contra *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas spp.* e *Giardia lamblia* (DANTAS et al., 2006). PRYTZYK et al. (2003), em testes *in vitro* com extratos de própolis, mostraram atividade contra as formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*, sendo uma possível alternativa para o tratamento da Doença de Chagas.

Testes *in vitro* também revelaram atividade da própolis brasileira no tratamento da leishimaniose (GIORGIO; RIBEIRO; AYRES, 2006).

Segundo MANARA et al. (1999), a própolis teve uma ação positiva na reorganização tecidual, ação antiinflamatória e antibacteriana, sendo na área odontológica, muito utilizada em enxaguatórios bucais e cremes dentais, para prevenção de cáries e tratamento de gengivites e estomatites (PIETA, GARDANA, PIETA, 2002).

Recentemente, foi publicada uma patente sobre a própolis intitulada "Composição bucal de uso tópico, enxaguatório bucal, solução bucal e dentrífcio, bem como o uso da referida composição", reivindicando o uso no combate à formação de placa bacteriana dental, prevenindo e/ou controlando a gengivite, problemas periodontais e/ou a cárie, infecções

causadas por diferentes etiologias, sem os inconvenientes do manchamento dentário intenso provocado pelo uso contínuo da clorexidina (D'OLIVEIRA, 2007).

### **3-5- Hidrogel**

Segundo SANINO et al. (2009), hidrogéis são redes poliméricas macromoleculares, de estrutura hidrofílica com capacidade de absorver e liberar água em resposta às condições ambientais. A quantidade de água retida na malha da rede do hidrogel pode ser definida pela estrutura da rede do polímero e por outros fatores, tais como temperatura, pH e força iônica da solução de água no contato com o polímero.

Em comparação com as redes poliméricas hidrofóbicas, como aquelas baseadas em ácido lático ou poli (ácido lático-ácido glicólico), que apresentam uma baixa capacidade de absorção de água, os hidrogéis fornecem uma série de propriedades únicas que constituem vantagens para seu uso em biomedicina. Aplicações, tais como a capacidade de encapsular biomacromoléculas, incluindo as proteínas e o DNA (KASHYAP, KUMAR, RAVI KUMAR, 2005).

Os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros naturais ou sintéticos. Aqueles à base de polímeros naturais apresentam, em geral, propriedades mecânicas fracas. Estas deficiências são corrigidas por um lado, pela sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (LIANG et.al, 2004).

Atualmente, os polissacarídeos vêm sendo utilizados para a produção de hidrogéis, pois são biocompatíveis, não tóxicos e apresentam importantes propriedades físico-químicas necessárias para aplicações biomédicas como a liberação controlada de fármacos (TONNESEN, KARLSEN, 2002).

A NaCMC, quando em contato com a água, apresenta alta capacidade de absorção de água, devido à rede polimérica formada por ligações intra e intermolecular. Assim, a água absorvida intumescer as redes poliméricas, sem se dissolver. Este “sólido como solução”, polímero e água resultando em equilíbrio é designado como hidrogel (SANINO et al., 2009).

Atualmente um dos campos de pesquisa mais importantes de hidrogéis é o sistema de liberação controlada de fármacos, principalmente devido ao desenvolvimento da farmacologia na última década. A associação de fármacos a compósitos hidrogel apresentam alguns benefícios: eliminação e liberação de drogas propiciando uma permanência mais prolongada do fármaco e conseqüentemente um melhor efeito; reduzir a degradação precoce de componentes bioativos por enzimas, antes que atinjam os locais alvejados (XINMING et al., 2008).

## **4-Material e Métodos**

### **4-1- Preparo do Hidrogel (NaCMC e Própolis)**

Utilizando uma balança semi-analítica eletrônica Gehaka (modelo BG 200), a NaCMC foi pesada e acondicionada no vidro de relógio. Na seqüência, utilizando uma proveta de 100 mL, mediu-se o volume de água destilada necessário para o preparo do hidrogel (Tabela 3). Posteriormente, verteu-se parte dessa água destilada para um bquer de 250mL e adicionou a NaCMC, pesada anteriormente. Com uma bagueta, misturou-se o preparado por 3 minutos e na seqüência a mistura foi homogeneizada no ultrassom (Lavadora ultra-sônica Unique-Ultra Cleaner), durante 15 minutos, sendo para isto, acrescentado o restante da água.

Ao final deste procedimento, foi adicionada a própolis, através de uma pipeta automática, conforme concentrações específicas para cada tipo de gel (Tabela 3). A mistura seguiu novamente para o ultrassom até a total homogeneização do hidrogel com a própolis.

A própolis utilizada no desenvolvimento dos hidrogéis foi o extrato alcoólico de própolis a partir do extrato padronizado de própolis [(EPP-AF), sob processo de patente (PI0405483-0), (publicado na Revista de Propriedade Industrial n. 1778 de 01/02/2005)], fornecido pela Empresa Apis Flora. Deste modo, foram obtidos quatro diferentes hidrogéis conforme concentrações de própolis: Hidrogel 1 (1% própolis), Hidrogel 2 (2% de própolis), Hidrogel 3 (8% de própolis) e Hidrogel 4 (sem adição de própolis) (Tabela 3).

Estas concentrações de hidrogéis foram determinadas a partir de ensaios microbiológicos realizados previamente ao início deste trabalho.

Todo o desenvolvimento e preparo dos hidrogéis foi realizado no Departamento de Química Inorgânica, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara-SP.



Tabela 3-Massa e volume dos reagentes utilizados para preparo dos hidrogéis (NaCMC e PRÓPOLIS).

| Reagentes            | Hidrogel    |            |            |      |
|----------------------|-------------|------------|------------|------|
|                      | 1           | 2          | 3          | 4    |
| CMC                  | 4g          | 4g         | 4g         | 4g   |
| Própolis (massa)     | (1%) 0,04g  | (2%) 0,08g | (8%) 0,32g | —    |
| Própolis<br>(volume) | (1%) 0,35mL | (2%) 0,7mL | (8%) 2,9mL | —    |
| Água destilada       | 95,65mL     | 95,3mL     | 93,1mL     | 96mL |
| (q.s.p. 100%)        | ~ 95,8mL    | ~95,6mL    |            |      |

## 4-2- Métodos de Caracterização

### 4-2-1- Caracterização Estrutural

As técnicas para a caracterização ou análise estrutural permitem a identificação e determinação de grupos funcionais, assim como, o estudo da conformação e estrutura de macromoléculas da substância ou composto a ser estudado.

Foram realizados a espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FT-IR).

#### 4-2-1-1- Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FT-IR)

Essa técnica é utilizada para identificação de compostos orgânicos ou inorgânicos puros, com exceção de moléculas homonucleares, sendo importante para determinar a presença dos compostos na amostra estudada (SILVERSTEIN, 2000).

A fonte da radiação infravermelha é uma fonte aquecida eletricamente alcançando a temperatura de 1.000 a 1.800°C, podendo ser usados como material de radiação óxidos de zircônio, tório e cério ou carvão de silício (SILVERSTEIN, 2000).

A radiação infravermelha localizada nos comprimentos de onda de 1000nm a 100nm (nanômetros), corresponde a um milésimo do milímetro e também equivale a uma frequência de cerca de  $3 \times 10^{14}$  Hz, que é comparável com a frequência com que as moléculas vibram.

A incidência da radiação infravermelha excita as moléculas, provocando vibração dos átomos na estrutura molecular, produzindo dipolos elétricos que agem com o mecanismo de interação, permitindo a transferência de energia entre os compostos e a luz emitida (radiação), desde que a frequência com que ambos variam seja a mesma, favorecendo alterações nos ângulos (deformação axial) e na distância entre os átomos (estiramento ou deformação).

Para que esta técnica seja realizada é necessária uma amostra do material, onde à medida que a radiação incide na amostra, esta se divide em dois feixes de radiação, sendo um feixe de referência e outro feixe da amostra. Posteriormente, a radiação é refratada em diferentes espelhos, até que a mesma passe por uma fenda, onde seu espaço é igual ao comprimento de onda incidido pela radiação. Quando a radiação é absorvida pela amostra, a intensidade dos feixes é comparada no detector e a redução é monitorada. Assim, são obtidos espectros característicos dos grupos, no qual, observa-se a formação de vales (SILVERSTEIN, 2000).

Os espectros vibracionais na região do infravermelho para as amostras do hidrogel de NaCMC-própolis foram obtidos no espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer. Para realização desta técnica foi necessário previamente preparar um pastilha de KBr pulverizado e a partir desta, acondicionar uma amostra do hidrogel sobre a pastilha e iniciar a aferição sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 32 varreduras, com resolução de  $2\text{cm}^{-1}$ , na faixa de absorção de  $4000\text{-}370\text{cm}^{-1}$ .

#### **4-2-2- Caracterização Morfológica**

A caracterização morfológica permite o estudo da estrutura fina morfológica dos materiais, a qual foi avaliada neste trabalho por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

##### **4-2-2-1- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Diferentemente do microscópio óptico, que usa luz para formação de imagem, os microscópios eletrônicos utilizam elétrons. A principal vantagem do uso do microscópio eletrônico é a resolução, definida como a menor distância entre dois pontos da amostra que podem ser visualizados como dois pontos distintos na imagem (AZEVEDO, 2006).

Nesta técnica é incidido um feixe de 2 a 3nm de elétrons, que penetram na superfície na amostra, interagindo com seus átomos e produzindo sinais como elétrons secundários, elétrons retroespalhados, elétrons Auger, Raios X, e luz visível, capturados por detectores apropriados (AZEVEDO, 2006).

Esta técnica é aplicada para determinar, segundo Azevedo (2006):

- Tamanho, forma e arranjo das partículas da amostra e a relação entre elas numa escala nanométrica;
- Informações cristalográficas (grau de cristalinidade das amostras);
- Aplicações biológicas e seus efeitos;
- Obtenção de elementos e compostos[ o microscópio eletrônico de varredura é um dos equipamentos mais utilizados nas pesquisas de materiais, devido a obtenção de imagens tridimensionais, alta profundidade, o que possibilita obter diferentes relevos na superfície, imagens de alta resolução e manuseio relativamente simples.]

As micrografias foram obtidas no microscópio eletrônico modelo JEOL JMF-6700F. A amostra foi colocada em suporte de cobre, recoberta com uma camada de ouro com espessura de 1nm durante 60 segundos com tensão de 3KV e corrente de 9,5 $\mu$ A. Esta técnica foi realizada com as amostras liofilizadas dos hidrogéis de NaCMC puro e NaCMC própolis 8%.

#### **4-2-3-Ensaio Antimicrobiano**

Nesta técnica podemos identificar a reprodução e/ou morte de microorganismos em uma amostra quando este é colocado num meio onde se deseja avaliar sua proliferação, assim pode-se verificar se o material estudado tem efeito antimicrobiano (PELCZAR, 1996).

A inativação ou a morte de microorganismos é observada por meio de um halo de inibição formado no material estudado e, assim, observar sua eficiência sobre determinado agente antimicrobianos, segundo Pelczar (1996):

- Tamanho da população microbiana; neste aspecto, as populações maiores demoram mais tempo para morrer, ao contrário de populações menores;

- Intensidade ou concentração do agente microbicida (agentes antimicrobianos que matam os micro-organismos); quanto maior a intensidade ou concentração, menor o tempo de destruição dos micro-organismos;

- Tempo de exposição ao agente microbicida; quanto maior o tempo de exposição, maior será a destruição dos micro-organismos;

- Temperatura de exposição dos micro-organismos; quanto maior a temperatura de exposição, mais rápida é a morte da população;

- Natureza do material que contém os microrganismos; várias características do material podem influenciar a morte celular causada pelo agente microbicida, como pH, estado físico entre outros aspectos;

- Características dos micro-organismos que estão presentes; os micro-organismos apresentam distinções quanto à resistência a agentes antimicrobianos.

Um agente químico ideal apresenta eficiência sob todas as condições, mas não existe nenhum composto químico com todas essas características (PELCZAR, 1996).

As especificações para um agente químico ideal são:

- Atividade antimicrobiana; o composto químico, em baixas concentrações, deve apresentar ampla eficiência no espectro da atividade antimicrobiana;

- Solubilidade; a substância deve ser solúvel em água ou outros solventes como álcool, em quantidades suficientes para garantir seu efeito;

- Estabilidade; seu armazenamento não deve alterar sua capacidade antimicrobiana significativamente;

- Ausência de toxicidade; a substância não deve ser nociva à saúde do homem e dos animais;

- Homogeneidade; as preparações devem apresentar uniformidade com a substância (agente químico) para que durante suas aplicações estejam presentes componentes ativos;

- Inativação mínima por material estranho; o material estranho não deve combinar-se com outro componente do material estudado, para que sua quantidade e efeito não sejam alterados para agir com os microorganismos.

- Atividade em temperaturas ambiente ou corporal; seu efeito antimicrobiano deve ser a temperatura ambiente ou corporal, sem que para a sua ativação seja necessário aumentar a temperatura;

- Poder de penetração; a menos, que a substância penetre por meio da superfície de contato, o efeito antimicrobiano é limitado ao local da aplicação;

- Ausência de poderes corrosivos e tintoriais; a substância não deve apresentar efeitos danosos ao material estudado;

- Poder desodorizante; a substância deve ser inodora ou apresentar odor agradável. Esta característica desodorizante é desejável;

- Capacidade detergente; a capacidade da substância de remover mecanicamente os micro-organismos da superfície tratada;

- Disponibilidade e baixo custo; a substância deve ser facilmente encontrada e de baixo custo (PELCZAR, 1996).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita pelo método de difusão em disco.

O ensaio antimicrobiano foi realizado para cepa de *Staphylococcus aureus* por ser o microorganismo mais frequentemente envolvido nos processos infecciosos pós-operatórios da coluna vertebral (FALAVIGNA, 2006). Para tanto, estes microrganismos foram semeados em placa Agar, utilizando como meio de cultura o manitol. O estudo foi realizado em seis placas contendo estes meios de cultura e semeado o microrganismo sobre o mesmo com uma densidade óptica (D O) de  $0,35 - 10^7$  mos/mL. Os materiais testados foram colocados sobre papéis filtros de 0,5 cm de diâmetro, sobre o meio com o microrganismo. Contudo, o controle positivo (clorexidina 0,12%) e as respectivas amostras (hidrogel NaCMC – 1% de própolis;

hidrogel NaCMC – 2% de própolis; hidrogel NaCMC – 8% de própolis) e o controle negativo (hidrogel de NaCMC) foram adicionados sobre os papéis filtros, como exemplificado na Figura 6. As placas foram incubadas por 48 horas a uma temperatura de 37°C.

Após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento do *S. aureus* foram medidos com paquímetro digital. Os dados foram avaliados pelo teste ANOVA e aplicado o teste de Dunnett para comparação entre os diferentes géis e a clorexidina (controle positivo), com nível de significância de 5%.

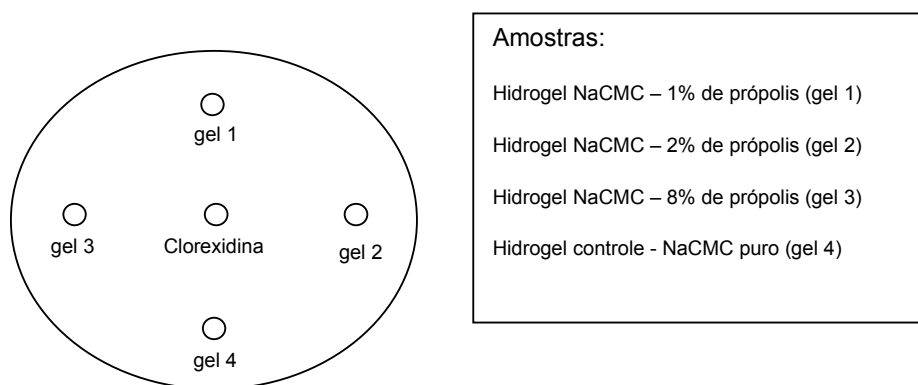


Figura 6 – Esquematização de placa de cultura *S. Aureus* com géis (NaCMC e Própolis)

## 5- Resultados e Discussão

### 5-1. Aspecto dos Hidrogéis

Os hidrogéis NaCMC-própolis apresentaram aspecto viscoso, sendo que a presença da própolis no material estudado apresentou variação da coloração âmbar em detrimento das diferentes concentrações de própolis nos hidrogéis, conforme demonstrado na Figura 7.

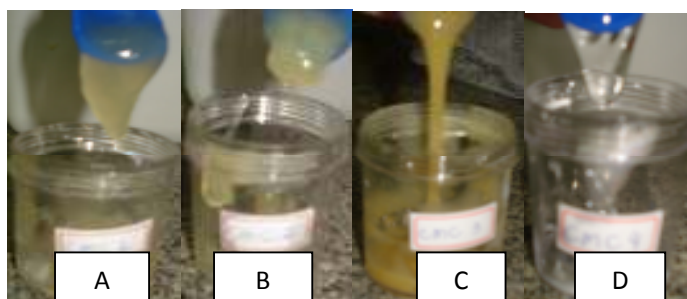


Figura 7 –Aspecto macroscópico dos hidrogéis após o preparo: A) hidrogel de NaCMC + própolis 1%; B) hidrogel de NaCMC + própolis 2%; C) hidrogel de NaCMC + própolis 8%; D) hidrogel de NaCMC puro.

### 5-2- Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho permitiu a identificação qualitativa de grupos funcionais presentes nos hidrogéis de NaCMC – própolis nas amostras liofilizadas representada na Figura 8.

As bandas características do hidrogel de NaCMC puro é apresentado na Figura 8 (e). As bandas de absorção no intervalo 3200-3480  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos ao grupamento OH, o intervalo 3260-3310  $\text{cm}^{-1}$  ao grupamento COO, no intervalo 2960-2878  $\text{cm}^{-1}$  ao grupamento CH, no intervalo 1618-1420  $\text{cm}^{-1}$  grupos carboxilato e bandas encontradas no intervalo 1100-900 ao grupamento C-O-C (LIN et al., 2005).



A banda larga do espectro que caracteriza a NaCMC é a de  $1043\text{ cm}^{-1}$  apresentada pela presença de grupos funcionais C—O e C—C, pela substituição dos grupos da celulose pelo éter carboximetil ( $\text{CH}_3\text{—O—CH}_2\text{—COONa}^+$ ) (ROKHADE, 2006).

A figura 8 (a) apresenta as bandas características da própolis. As bandas de absorção no intervalo  $3415\text{--}3220\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao grupamento OH, o intervalo  $2910\text{--}2840\text{ cm}^{-1}$  ao grupamento CH, a banda  $1700\text{ cm}^{-1}$  grupamento C=O, atribuído a lipídios e flavonóides. Os alcoóis terciário, secundário e primário são encontrados respectivamente nas bandas;  $1160\text{ cm}^{-1}$ ,  $1080\text{ cm}^{-1}$  e  $1040\text{ cm}^{-1}$  (PATACA, 2006).

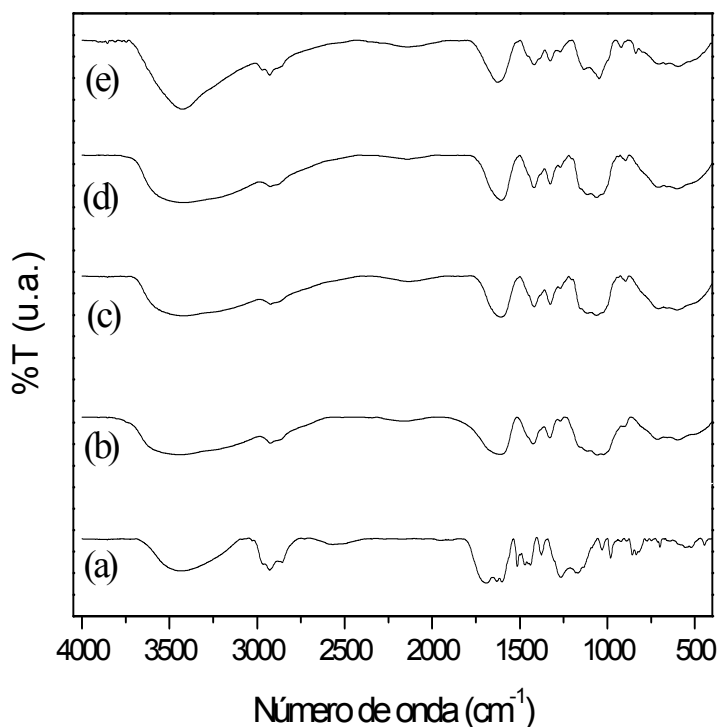


Figura 8 – Espectroscopia vibracional na região do infravermelho de amostras dos géis liofilizadas: (a) própolis (b) hidrogel de NaCMC + própolis 1%; (c) hidrogel de NaCMC + própolis 2%; (d) hidrogel de NaCMC + própolis 8%; (e) hidrogel puro de NaCMC.

A presença da própolis no compósito pode ser confirmada através da banda localizada ao redor de  $1250\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  pela presença de grupos funcionais OH fora do plano. Este dado pode ser observado pelo aumento da banda com a adição da própolis ao hidrogel. Esta banda confirma a formação de ligações entre a NaCMC e a própolis (MANSUR, 2002).

As bandas obtidas no hidrogel de NaCMC - própolis 8% diferem dos demais, porque a banda característica da presença da própolis está reduzida neste hidrogel, sendo este de maior concentração de própolis que os outros hidrogéis.

Segundo COVA (2000), a NaCMC é insolúvel em álcool. Este dado pode ser observado nos resultados das bandas de própolis, a qual é solúvel em álcool e insolúvel em água, diferindo do polímero, sendo assim a NaCMC não adsorve o álcool essencial para solubilidade da própolis e portanto, observa-se redução da concentração da própolis ao hidrogel com maior quantidade da substância.

### **5-3- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A realização desta técnica para as amostras de hidrogéis foram importantes para demonstrar a presença das fibras e a porosidade dos hidrogéis.

As figuras 9 (a) e (b) são referentes ao hidrogel de NaCMC puro liofilizado. Apresenta um material poroso característico de um hidrogel, pois com a entrada de água nas cadeias do polímero, ocorre tensão nas cadeias com o intumescimento do NaCMC e aumento do tamanho dos poros (MYUNG et al., 2008).

A NaCMC em contato com a água apresentou alta capacidade de absorção, devido à rede polimérica formada por ligações intra e intermolecular. Assim, a água absorvida distende as redes poliméricas, sem se dissolver (SANINO et al., 2009).

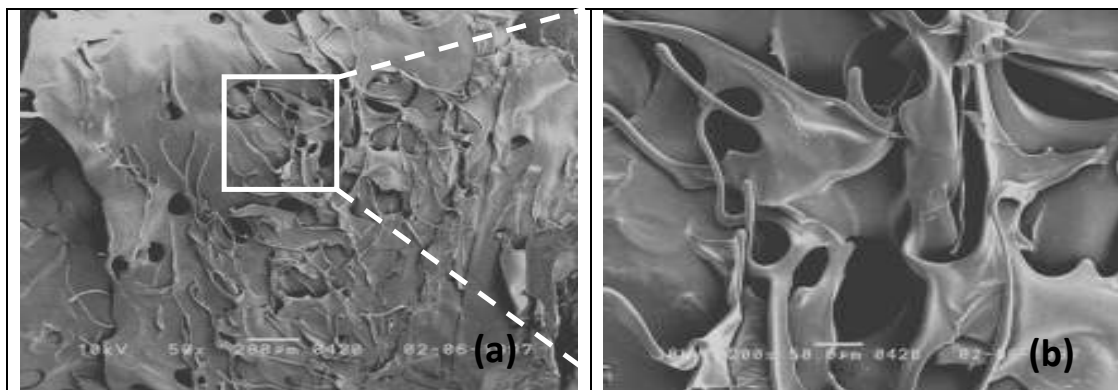


Figura 9 – Microscopia Eletrônica de Varredura do hidrogel de NaCMC puro liofilizado. a) Em destaque uma região com alta porosidade do hidrogel; b) Os poros do hidrogel (“microporos”) podem ser claramente observados. A, 200μm; B, 50μm.

As figuras 10 (a) e (b) referem-se a micrografias da amostra do hidrogel NaCMC - própolis 8%; as imagens revelaram características similares ao hidrogel NaCMC puro, somente com uma estrutura mais porosa que o mesmo hidrogel, demonstrando que a presença de própolis não altera a propriedades microscópica do hidrogel.

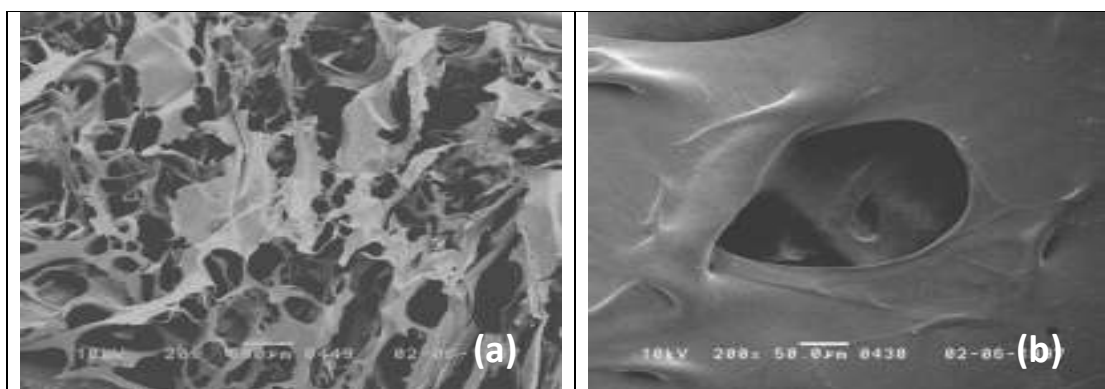


Figura 10 - Microscopia Eletrônica de Varredura do hidrogel de NaCMC- própolis 8%: a) uma região com alta porosidade do hidrogel e ao lado, as micro fibras do hidrogel (“micro celulose”) e micro poros podem ser claramente observados. A, 500μm; B, 50μm.

#### 5-4- Caracterização Microbiológica

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos hidrogéis, avaliou-se o comportamento do microorganismo em relação à presença, ausência e tamanho do halo de inibição.

Decorrido o período de incubação, observou-se que o hidrogel de NaCMC com 8% de própolis não apresentou diferença estatisticamente significativa no halo de inibição para cepa de *S. aureos* em relação ao grupo do controle positivo (clorexidina) 0,12% ( $p < 0,001$ ) (Figuras 11 e 12). Contudo, os hidrogéis 1 e 2 apresentaram halos de inibição menores estatisticamente em relação à clorexidina e ao hidrogel 3, e o hidrogel de NaCMC puro, não teve halo de inibição. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as placas ( $p = 0,50$ ). Os valores dos halos de inibição estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores dos halos de inibição para *S. aureos*.

\* Diferença Estatisticamente significativa a 5%

| Placas | Hidrogel NaCMC- 1%<br>própolis | Hidrogel NaCMC-2%<br>própolis | Hidrogel NaCMC-<br>8% própolis | Clorexidina<br>0,12% |
|--------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------|
| 1      | 1,8                            | 1,7                           | 2,7                            | 2,8                  |
| 2      | 1,5                            | 1,9                           | 3,2                            | 2,6                  |
| 3      | 1,9                            | 1,8                           | 2,5                            | 3,1                  |
| 4      | 1,5                            | 1,9                           | 3,5                            | 3                    |
| 5      | 1,7                            | 1,5                           | 2,6                            | 3                    |
| 6      | 1,9                            | 1,8                           | 3,4                            | 3                    |
| média  | 1,7*                           | 1,8*                          | 3,0                            | 2,9                  |

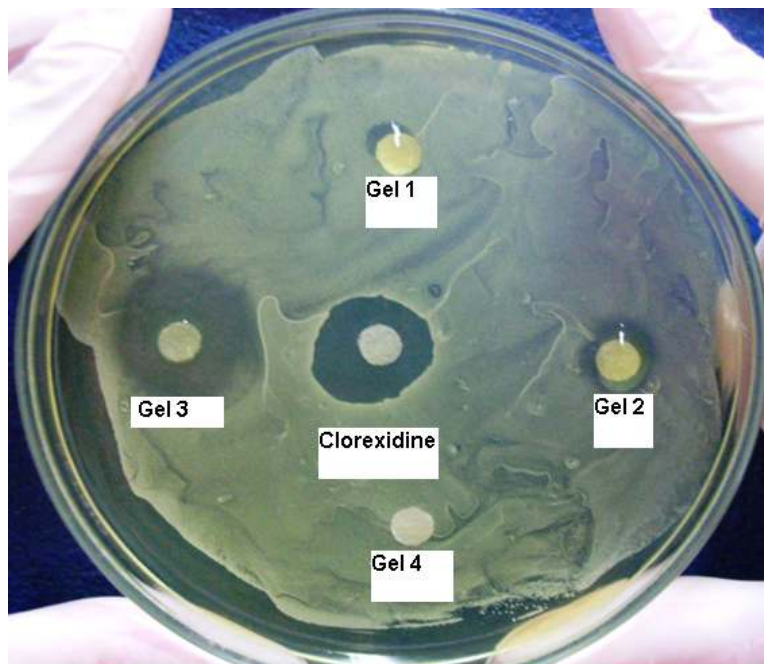


Figura 11 – Halos de inibição para: Gel 1 (NaCMC-própolis 1%), Gel 2 (NaCMC-própolis 2%), Gel 3 (NaCMC-própolis 8%), Gel 4 (NaCMC puro), Controle positivo (clorixidina).

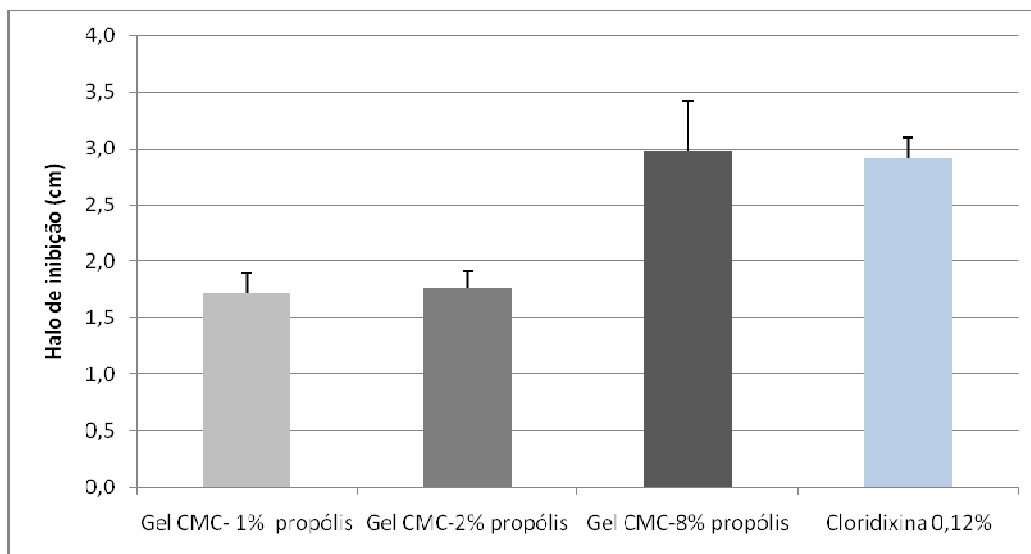


Figura 12 – Médias dos halos de inibição dos respectivos Hidrogéis e da clorixidina. As barras representam o desvio padrão dos mesmo.

Acredita-se que cerca de até 10% dos pacientes submetidos a cirurgias da coluna vertebral, possam apresentar complicações infecciosas, sendo uma das causas de morbidade deste procedimento (FALAVIGNA, 2006). O *S. aureos* é o microorganismo mais freqüentemente isolado nestas infecções, cerca de 90% (FALAVIGNA, 2006).

O tratamento desta morbidade inclui o uso de antibióticos intravenosos, e em muitos casos drenagem cirúrgicas, o que prejudica a recuperação dos pacientes.

Lu (2005) demonstrou em estudo *in vitro* que o extrato de própolis inibiu o crescimento do *S. aureos*, sendo que esta atividade antimicrobiana poderia ser aproveitada como alternativa profilática ao desenvolvimento de processos infecciosos envolvendo este microorganismo.

Neste trabalho, o hidrogel de NaCMC com própolis 8%, evidenciou uma ótima atividade anti estafilocócica, semelhante ao controle de clorixidina, e assim o uso *in vivo* poderia prevenir o desenvolvimento de complicações infecciosas, nos procedimentos de cirurgia de coluna vertebral.

## 6- CONCLUSÕES

Segundo os objetivos propostos e metodologia utilizada podemos concluir que:

- A presença de própolis no compósito pode ser confirmada, no estudo de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, através da banda localizada ao redor de  $1250-1000\text{ cm}^{-1}$ , pela presença de grupos funcionais OH fora do plano;

- O aspecto poroso, característico dos hidrogéis, ficou evidente no estudo da microscopia eletrônica de varredura;

- A própolis confirmou sua característica antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*;

- O desenvolvimento dos hidrogéis envolveu um custo baixo, pois tanto a NaCMC quanto o extrato de própolis são produtos encontrados facilmente no mercado brasileiro. Estudos futuros *in vivo* poderão ser realizados com o hidrogel NaCMC – própolis 8% para comprovação do potencial antifibrótico em cirurgias neurológicas e de coluna vertebral.

## 7- Referências Bibliográficas

AHN,M.; et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chem**, Tokyo, v.101, p.1383-92, 2007.

ARVOUET-GRAND,A.;et al. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. **J Pharm Belg**, Clermont-Ferrand,v.49( 6), p.462-468,1994.

ALENCAR,S.M.; et al. Composição Química de Baccharis dracunculifolia, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **C Rural**, v.35, p.909-915,2005. Disponível em:< [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782005000400025](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782005000400025)>. Acesso em: 3 dez. 2009.

AZEVEDO, R.B. Microscopia Eletrônica. In : DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**.São Paulo: Artliber Editora, 2006. p.89-108.

BANKOVA,V. *Chemical diversity of propolis and problem of standardization*. **J Ethnopharmacol**, Sofia, v.100, p.114-117, 2005.

BARUD, S.H.: Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana. Dissertação de Mestrado.2006. 114 f. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

BORRELLI,F.;et al. Phytochemical compounds involved in the anflamatory effect of própolis extract. **Fitoterapia**,Naples, v.73, n. 1, p.53-63, 2002.

BURDOCK,G.A. Reviem of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food Chem Toxicol**, Flórida, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

CAPASSO,F.;CASTALDO,S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**,Naples, v.73, n.1, p.1-6, 2002.



COVA, L.S.G. **Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico**. Metal Check do Brasil Industria Ltda. 2000. p.3.

COLLINS,I.; et al. The diagnosis and management of infection following instrumented spinal fusion. **Eur Spine J**, Oxford, v. 17, p.445–450, 2008.

CUSHNIE,T.P.;LAMB,A.J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. **Antimicrobial Agents**, Aberdeen, v.26, p.343-356, 2005.

D'Oliveira, R.J.D. **Composição bucal de uso tópico, exagatório bucal,solução bucal e dentrificio, bem como o uso da referida composição**. BR/RJ PI 0502111-1 A, 2007.

DANTAS A.P.;et al.Treatment of Trypanosoma cruzi-infected mice with própolis promotes changes in the immune response. **JEthnopharmacol**, Rio de Janeiro, v.103, p.187-193, july, 2006.

FALAVIGNA, A.; et al. Manejo da infecção após cirurgia de fixação interna da coluna lombar.**Arq Neuro-psiquiatr**, Caxias do Sul, v.64, n.4, p.1001-04, Ago, 2006.

FERNANDE,S,Jr,A.; et al. Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity synergism with antimicrobial drugs.**Mem. Inst. Oswaldo** ,Botucatu,v.100,n.5,p.563-566,August,2005.Disponivem em: < <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v100n5/v100n5a18.pdf>>.Acesso em: 10 out. 2009.

FUNARI,C.S.; FERRO,V.O. Análise de Própolis. **Ciênc Tecnol Alimen**,São Paulo,v.26,n.1,p.171-178, jan,2006.Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28867.pdf>>. Acesso em 17 dez. 2009.

GEKKER,G.; et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4 lymphocyte and microglial cell cultures. **J Ethnopharmacol**, Minneapolis, v.102, p.158-163, May, 2005.

GIORGIO,S.;RIBEIRO,M.C.M.;AYRES,D.C. **Composições medicamentosas a base de própolis brasileira tipificada com atividade leshmanicida e método de tratamento**. BR/SP PI 0601863-7 A, 2006.

GREGORY,S.R.;et al. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **J Altern Complement Med**, Texas, v.8, n.1, p.77-83, July, 2002.

HAYACIBARA,M.F.; et al. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol**, Piracicaba, v.101, n.3, p.110-115, October, 2005.

HU,F.;et al. Effects of ethanol and water extracts of propolis ( bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol**, Hangzhou, v.100, n.3, p.276-288, february, 2005.

KASHYAP,N.;KUMAR,N.;RAVI KUMAR,M.N.V. Hydrogels to pharmaceutical and biomedical application.**Critical Rev Therap Drug Systems**, New York, v.22, n.2, p.107-149,2005.

KENNEDY,J.F.et al. ( Ed.). **Cellulose and its derivatives: chemistry, biochemistry and applications**. Chichester: Ellis Horwood; New York: John Wiley & Sons, 1985. 551 p.

KORSALEC,I.;et al. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharm**,Zagreb,v.55,p.423-430,November,2005.

LIANG,H.F.;HONG,M.H.;HO,R.M.;CHUNG,C.K.;LIN,Y.H.;CHEN,C.H.;SUNG,H.W. Novel method using a temperature-sensitive polymer ( methylcellulose) to thermally gel aqueous alginate as a pH sensitive hydrogel. **Biomacromoleculs**,Taiwan, v.4, p.1917-1925, 2004.

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

LIN,O.H.;KUMAR,R.N.ROZMAN,H.D.;NOOR,M.A.M. Grafting of sodium carboxymethylcellulose (CMC) with glycidyl methacrylate and development of UV curable coatings from CMC-g-GMA induced by cationic photoinitiators **.Carbohydrate Polymers**, Palau Pinang, v.59, p.57-89, jan, 2005.

LONGHINI,R.;et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica.**Rev Bras Farmacog**, João Pessoa, v.17, n.3, p.388-395, set, 2007.

LU,L.;CHEN,Y.;CHOU, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **J Food Microbiol**,Taipei,v.102,p.213-220,Dec,2005

MANARA,L.R.B. et al. Utilização da própolis em odontologia. **Rev. FOB**, Bauru, v.7, n.3/4, p.15-20, dez, 1999.

MANSUR,H.;ORÉFICE,R.;PEREIRA,M.;LOBATO,Z.;VASCONCELOS,W.;MACHAD O,R. FTIR and UV-vis study of chemically engineered biomaterial surfaces for protein immobilization. **Spectroscopy**, Minas Gerais, v.16, n.2-3, p.351-360, jan, 2002.

MARQUELE,F.D.;et al. Propolis extract release evaluation from topical formulation by chemiluminescence and HPLC. **J Pharm Biomed** ,Riberão Preto, v.41, n.3, p.461-468, Dec, 2006.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quim Nova**, Campinas, v.19, n.1, p.1-2, maio, 1996.

MARCUCCI,M.V. Propolis: chemical position, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Campinas, v.26, n.2, p83-99, June, 1995.

MARCUCCI, M.C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**, SãoPaulo, v.74, n.2, p.105-112, July, 2001.

MENEZES,H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de sua propriedades farmacológicas. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, set, 2005.

MOREIRA,T.F. Composição química do própolis: Vitaminas e aminoácidos. **Rev bras farmacogn**, São Paulo, v.1, n.1, p.12-19, maio, 1986.

MYUNG,D. et al. Progress in the development of interpenetrating polymer network hydrogels. **Polymer Adv Technologis**, v.19, p.647-657, June,2008.

ONLEN,Y. et al. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on Pseudomonas Kerativis in rabbits. **Microbiology**, Antakya/Hatay, v.162, n.1, p.62-68, July, 2007.

ORSOLIC,N. et al. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J Ethnopharmacol**, Zagreb, v.94, n.2, p.307-315, Oct, 2004.

OZKUL,Y.;SILICI,S.;ERÖGLU,E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. **Phytomedicine**, Kayseri, v.12, n.10, p.742-747, June, 2004.

PARK,Y.K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **C Rural**,Campinas,v.2,n.6,p.997-1003,dez,2002. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n6/12745.pdf>>. Acesso em: 14 nov.2009.

PARK,Y.K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e sua aplicações. **Ciênc Tecnol de Aliment**,Campinas,v.18,n.3,p.313-318,out,1998.Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611998000300011&script=sci\\_arttext&tlng=in](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20611998000300011&script=sci_arttext&tlng=in)>. Acesso em :12 out. 2009.

PATACA,L.C.M.;LEAL,L.H.Q.;MARCUCCI,M.C.;POPPI,R.J. Determinação da tipagem da própolis utilizando Espectroscopia no Infravermelho e PLS-DA. 29º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2009.

PELCZAR JR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed.São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996, v.1, p.191-193; 211-213.

PEREIRA,A.S.;SEIXAS,F.R.M.S.;AQUINO,N. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim Nova**,Rio de Janeiro,v.25,n.2,p.321-326,jul,2002.Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n2/10460.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2009.

PIETTA,P.G.;GARDANA,C.;PIETAA,A.M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, Segrat, v.73, n.1, p.7-20, Nov, 2002.

PRYTZYK,E. et al. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian própolis. **J Ethnopharmacol**, Rio de janeiro, v.88, n.2, p.189-193, Oct,2003.

REGIANI,M.R. **Eletrólitos sólidos à base de polissacarídeos**: síntese e caracterização. 2000. 176 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROCHA,L. et al . Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn**, Maringá, v.13, n.1, p.71-74, Abr, 2003.

RODGERS,K.E. et al. Reduction of epidural fibrosis in lumbar surgery with Oxiplex adhesion barriers of carboximethylcellulose and polyethylene oxide. **S Journal**, San Diego, v.3, n.4, p.277-83, Oct, 2003.

ROKHADE,A.P.;AGNIHOTRI,S.A.;PATIL,S.A.;MALLIKARJUNA,N.N.;KULKARNI,P . V.;AMINABHAVI,M.T. Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. **Carbohydrate Polymers**, Dallas, v.65, n.3, p.243-252, August, 2006.

SANINO,A.;DEMITRI,C.;MADAGHIELE,M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. **Materials**,Lecce,v.2,n.1,p.353-373,Apr,2009.Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1996-1944/2/2/353/pdf>>. Acesso em 11 dez.2009.

SHUB,T.A. et al. Effect of propolis on strains of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics. **Antibiotiki**, Russian, v.26, n.4, p.268-271, Apr, 1981.

SILVERSTEIN, R. M.;WEBSTER,F.X.;KIEMLE,D.J. **Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2000.p.26-59.

SIMÕES,L.M.C. et al. Effect of Brazilian Green própolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **J Ethnopharmacol**, Riberão Preto, v.94, n.1, p.59-65, Sep, 2004.

SIMÕES,C.C.;ARAÚJO,D.B.;ARAÚJO,R.P.C. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microorganismos presentes na saliva de humanos. **Rev bras farmacogn**, João Pessoa, v.18, n.1, p.84-89, mar, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2008000100016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000100016)>. Acesso em : 11 nov. 2009.

SCAZZOCCHIO,F. et al. Multifatorial aspects of antimicrobial activity of própolis. **Microbiology**, Romev.161, n.4, p.327-333, Nov, 2006.

SCHOFFERMAN,J.;REYNOLDS,J.;HERZOG,R. Failed back surgery: etiology and diagnostic evaluation. **Spine**, San Francisco, v.3, n.5, p.400-403, Oct, 2003.

SOUZA,J.P.B.;et al. Perfil físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca(SP) e Passos(MG). **Revista Brasileira de farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, p.85-93, mar, 2007. Disponível em :<<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a17v17n1.pdf>> Acesso em: 17 jun. 2009.

SFORCIN,J.M. et al. Seasonal effect on Brazilian própolis antibacterial activity. **J Ethnopharmacol**, Botucatu, v.73, n.1, p.243-249, Nov, 2000.

STEINBUCHER, A.; MARCHESSAULT, R.H. **Biopolymers for medical and pharmaceutical applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.v.1.p.361.

STEPANOVIC,S. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiology**, Belgrade, v.158, n.4, p.353-357, Nov, 2003.

SU,J.F.;et al. Structure and properties of carboxymethyl cellulose / soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. **Carbohydr Polymers**, Tianjin, v.79, n.1, p.145-153, Jan, 2009.

SY,L.B. et al. Propolis extracts exhibit an immunoregulatory activity in an OVA-sensitized airway inflammatory animal model. **Immunopharmacology**, Taipei, v6, n.7, p.1053-1060, July, 2006.

TONNESEN,H.H.;KARLSEN,J. **Alginate in Drug Delivery Systems**. Drug Development Pharmacy, Oslo, v.28, p.621-630, 2002.

TRUSHEVA,B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat Med.**,Sofia,v.3,n.2,p.249-254,Jun,2006. Disponível em: <<http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/reprint/3/2/249>> Acesso em: 19 nov. 2009.

UZEL,A. et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiology**, Bornova-İzmir v.160,n.2,p.189-195,Apr,2005.

VAN GOETHEM,J.W.N.;PARIZEL,P.M.;JINKINS,J.R. MRI of the postoperative lumbar spine. **Neuroradiology**,Edegen,v.44,n.9,p.723-739,Aug,2002. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/xenxltcukmu20w27/fulltext.pdf>>Acesso em: 15 set. 2008.

VYNOGRAD,N.;VYNOGRAD,I.;SOSNOWSKI,Z.A. Comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**,Ukraine,v.7,n.1,p.1-6,Mar,2000.

XINMING,L.;YINGDE,C.;JIANLIANG,X.;LIEWEN,L. Hydrogel-hydrogel composites: The interfacial structure and interaction between water and polymer chains. **J Polymer Sciene**, Liverpool, v.108, n.3, p.3713-3719, 2008.

WOISK,R.G.;SALATINO,A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apic Res**, São Paulo, v.37, n.2, p.99-105, 1998.