Universidade do Minho
Escola de Ciências

Soraia Cristina Vieira Rodrigues

Impressão de filmes de quitosano e extrato de própolis com propriedades antimicrobianas

outubro de 2024

Impressão de filmes de quitosano e extrato de própolis com propriedades antimicrobianas

Soraia Cristina Vieira Rodrigues

UMinho | 2024

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Soraia Cristina Vieira Rodrigues

Impressão de filmes de quitosano e extrato de própolis com propriedades antimicrobianas

Dissertação de Mestrado
Biologia Molecular,
Biotecnologia e
Bioempreendedorismo em
Plantas

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Cristina Alexandra Almeida Aguiar
e
Professor Doutor Pedro Manuel Abreu Martins

outubro de 2024

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/pt/

AGRADECIMENTOS

Naquilo que representa o fim de uma etapa tão importante e marcante para o meu futuro tanto pessoal como profissional seria impossível não agradecer a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores Doutora Cristina Aguiar e Doutor Pedro Martins pelo apoio incansável, por todas as oportunidades, pela ajuda e entrega em cada passo desde o início ao fim desta fase.

Aos colegas do laboratório ESM do IB-S e de Biodiversidade do Departamento de Biologia por mostrarem que um bom ambiente de trabalho e uma base de entreajuda serão sempre a resposta para o sucesso. Ao trabalho incansável de todos os técnicos de ambos os edifícios que permitiram que tivéssemos sempre todas as condições necessárias de trabalho.

Ao Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez agradeço a disponibilidade e a oportunidade que me deu em ter ingressado no seu grupo de trabalho.

Finalmente, a quem desde pequena me mostrou que o gosto por aprender é metade do que precisamos para saber ensinar, às mulheres da minha vida. À minha avó, Rosa, à minha mãe Cristina e à minha madrinha Tânia, as pessoas a quem devo absolutamente tudo do que sou.

A todos vocês um sincero obrigada por tornarem isto possível.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

O tratamento de lesões cutâneas tem um elevado impacto económico mundial nos sistemas de saúde, com custos anuais que podem ultrapassar 96 mil milhões de dólares, tornando urgente a procura por alternativas económicas e sustentáveis. Uma das maiores preocupações nos cuidados com lesões é a prevenção de infeções microbianas. No entanto, as soluções atuais não atendem a todos os critérios necessários para o tratamento adequado desta patologia. De entre as várias desvantagens destas abordagens destaca-se a utilização de polimeros sintéticos, os seus efeitos secundários ou a dificuldade de personalização dos materiais desenvolvidos. A urgência por novas abordagens biodegradáveis e biocompatíveis tem levado ao desenvolvimento de alternativas baseadas em materiais naturais com propriedades antimicrobianas. O própolis — um subproduto da colmeia — tem despertado interesse devido à sua bioatividade, especialmente antimicrobiana, e já foi utilizado em várias aplicações, como cremes de aplicação tópica que exploram a sua atividade.

Desta forma, o presente trabalho visa colmatar as desvantagens acima citadas, com recurso a materiais sustentáveis e, ainda, tendo por base uma tecnologia de impressão 3D que permite a redução de desperdício de material e customização total dos mesmos. Nesse contexto, a impressão 3D possibilitou o desenvolvimento de materiais alternativos com personalização da forma, tamanho e possibilidade de prototipagem rápida. A integração de polímeros naturais, como o quitosano, emprega as suas bioatividades (*e.g.* antimicrobiana, proliferativa) e permite a incorporação de produtos como o própolis para aumentar a eficácia do material, dependendo da aplicação.

Este estudo teve como objetivo desenvolver uma formulação polimérica de quitosano e própolis para a impressão por DIW (escrita direta com tinta, do inglês *direct ink writing*) de filmes com propriedades antimicrobianas. O própolis de Gerês (G), recolhido em 2023, foi avaliado quanto aos parâmetros de qualidade (teor balsâmico, de ceras, cinzas e de humidade) e usado para preparar um extrato etanólico (EE). O extrato obtido - G23.EE - foi analisado quimicamente (teor de polifenóis totais, teor de flavonóides totais, teor de ortodifenóis totais) e biologicamente (atividade antioxidante e atividade antimicrobiana), foi incorporado na formulação de quitosano e foi impresso em filmes por DIW. Os filmes foram caracterizados por FTIR, SEM, ensaios mecânicos, UV-Vis, de inchamento e de degradação. A atividade antimicrobiana de G23.EE e dos filmes foi avaliada *in vitro* contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo usando ensaios de difusão em agar, difusão em disco e morte por contacto. A caracterização dos filmes demonstrou preservação da composição química conforme demonstrado pelo FTIR, percentagem de inchaço significativo (292,36% em PBS 1% (*v/v*) e 753,64% em dH_2O), biodegradabilidade por ensaio de degradação e capacidades antimicrobianas (formação de halos de inibição em *B. subtilis* e redução de 2,83 x UFC/mL em *S. aureus*). Em conclusão, os filmes produzidos por impressão 3D demonstraram atividade antimicrobiana, além de robustez químicas e físicas promissoras, integrando-os como uma possibilidade altamente viável para a produção de apósitos para lesões cutâneas.

Palavras-chave: *Antimicrobiano, Filmes, Lesões cutâneas, Própolis, Quitosano*

Abstract

The treatment of skin lesions has a high global economic impact on healthcare systems, with annual costs that can exceed 96 billion dollars, making the search for economical and sustainable alternatives urgent. One of the main concerns in wound care is the prevention of microbial infections. However, current solutions do not meet all the necessary criteria for the proper treatment of this condition. Among the various disadvantages of these approaches are the use of synthetic polymers, their side effects, and the difficulty in customizing the developed materials. The urgency for new biodegradable and biocompatible approaches has led to the development of alternatives based on natural materials with antimicrobial properties. Propolis—a hive by-product—has gained interest due to its bioactivity, especially antimicrobial, and has already been used in several applications, such as topical creams that exploit its activity. Thus, the present work aims to address the aforementioned disadvantages, on one hand, by using sustainable materials and, on the other, by employing 3D printing technology, which allows for the reduction of material waste and total customization. In this context, 3D printing enabled the development of alternative materials with customization in shape, size, and rapid prototyping capability. The integration of natural polymers such as chitosan harnesses its bioactivities (e.g., antimicrobial, proliferative) and allows the incorporation of products like propolis to enhance the material's efficacy depending on the application. This study aimed to develop a polymeric formulation of chitosan and propolis for DIW (direct ink writing) printing of films with antimicrobial properties. Propolis from Gerês (G), collected in 2023, was evaluated for quality parameters (balsamic, wax, ash, and moisture content) and used to prepare an ethanolic extract (EE). The obtained extract - G23.EE - was chemically analyzed (total polyphenol content, total flavonoid content, total ortho-diphenol content) and biologically assessed (antioxidant and antimicrobial activity). It was then incorporated into the chitosan formulation and printed into films using DIW. The films were characterized by FTIR, SEM, mechanical tests, UV-Vis, swelling, and degradation assays. The antimicrobial activity of G23.EE and the films was evaluated in vitro against Gram-positive and Gram-negative bacteria using agar diffusion, disc diffusion, and contact-kill assays. The characterization of the films demonstrated the preservation of chemical composition as shown by FTIR, significant swelling percentage (292.36% in 1% PBS (*v/v*) and 753.64% in dH2O), biodegradability in the degradation assay, and antimicrobial capabilities (formation of inhibition halos in *B. subtilis* and a reduction of 2.83 x CFU/mL in *S. aureus*). In conclusion, the films produced by 3D printing demonstrated antimicrobial activity, as well as promising chemical and physical robustness, positioning them as a highly viable option to produce dressings for skin lesions.

Keywords: *Antimicrobial, Chitosan; Films, Propolis; Skin Lesions*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS v

Resumo vii

Abstract viii

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS ..... xiii - xv

LISTA DE FIGURAS ..... xvi - xix

LISTA DE TABELAS xx

CAPÍTULO I: Introdução e Estado da arte

1. A importância da pele e da manutenção da sua integridade 1

2. Feridas cutâneas: uma problemática complexa e universal 4

2.1. Fases de cicatrização de uma ferida cutânea 4

2.1.1. Homeostasia 5

2.1.2. Inflamação 6

2.1.3. Infeções microbianas: estirpes associadas, modo de ação e consequências 7

2.1.4. Proliferação 9

2.1.5. Remodelação 10

2.2. Tratamentos convencionais de feridas cutâneas: limitações associadas 11

3. Própolis: origem do produto natural 19

3.1. Bioatividades e aplicações do própolis 20

3.2. Composição química do própolis mediante a localização geográfica da sua colmeia: Portugal, Europa e Mundo 25

3.3. Própolis português: o própolis do Gerês 29

3.4. A aplicação e versatilidade do própolis para o tratamento de feridas cutâneas 31

4. Manufatura aditiva (Impressão 3D) e contexto histórico 33

4.1. Tecnologias de impressão 3D 34

4.1.1. Impressão por jato de tinta 36

4.1.2. Impressão por extrusão 37
4.1.3. Impressão por microválvulas 38
4.1.4. Bio impressão por laser 39
4.2. Bio tintas de base polimérica sintética e natural 40
4.3. Integração da impressão 3D como ferramenta de customização no tratamento de feridas cutâneas 42
5. Motivação e objetivo 44
5.1. Metodologia 44
CAPÍTULO II: Materiais e Métodos
1. Amostra de própolis 46
1.1. Caracterização do própolis G23 46
1.1.1. Conteúdo balsâmico 46
1.1.2. Teor de humidade 47
1.1.3. Teor de cinzas 47
1.1.4. Teor de ceras 47
2. Obtenção do extrato etanólico de própolis do Gerês, G23.EE 48
2.1. Caracterização química do G23.EE 48
2.1.1. Determinação do teor de polifenóis totais (TPT) 48
2.1.2. Determinação do teor de flavonóides totais (TFT) 49
2.1.3. Determinação do teor de orto difenóis total (TOT) 49
2.2. Caracterização biológica e química do G23.EE 49
2.2.1. Avaliação do potencial antioxidante do G23.EE – ensaio de redução do radical livre DPPH• 49
2.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana do G23.EE 50
3. Processamento dos materiais para impressão 3D 51
3.1. Materiais e reagentes 51
3.2. Preparação das bio tintas 52

3.2.1. Otimização da formulação 53
3.3. Impressão e secagem das formulações 54
4. Caracterização dos filmes poliméricos 55
4.1. Microscopia eletrónica de varrimento 55
4.2. Espetroscopia de Infravermelhos em Modo de Refletância Total Atenuada 56
4.3. Ensaio de inchamento 57
4.4. Ensaio de degradação 58
4.5. Ensaio de tração 58
4.6. Ensaio de espetroscopia no UltraVioleta-Visível (UV-Vis) 59
4.7. Ensaios antimicrobianos 60
4.7.1. Ensaios para deteção de halos de inibição 60
4.7.2. Ensaio por contact killing ou morte por contacto 60

CAPÍTULO III: Resultados e Discussão

1. Parâmetros de qualidade do própolis G23 61
2. Obtenção do extrato G23.EE 63
3. Caracterização química e biológica do extrato G23.EE 65
3.1. Determinação do teor de flavonóides, polifenóis e ortodifenóis total do G23.EE 65
3.2. Potencial antioxidante do G23.EE 67
3.3. Atividade antimicrobiana do G23.EE 68
4. Impressão 3D dos filmes poliméricos 70
4.1. Otimização e impressão das formulações 70
5. Microscopia eletrónica de varrimento 74
6. Espetroscopia de Infravermelhos em Modo de Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR) 77
7. Ensaio de inchamento 79
8. Ensaio de degradação 85
9. Ensaio de tração 88

10. Ensaio de espetroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis) 90

11. Ensaios antimicrobianos 91

11.1. Ensaios para deteção de halos de inibição 91

11.2. Ensaios por morte por contacto ou *contact killing* 94

CAPÍTULO IV: Conclusões e Perspetivas Futuras

1. Conclusões 97

2. Perspetivas futuras 99

CAPÍTULO V: Bibliografia 100

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS

AA: Ácido acético

ATR: Refletância total atenuada, do inglês *Attenuated total reflectance*

ATR-FTIR: Espetroscopia de infravermelhos em modo de refletância total atenuada

bFGF: Fator de crescimento fibroblástico básico, do inglês *Fibroblast Growth Factor Basic*

Ch: Quitosano, do inglês *Chitosan*

COX-2: Ciclo-oxigenase 2, do inglês *Cyclooxygenase-2*

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos, do inglês *Damage-associated molecular pattern*

DIW: Escrita direta com tintadirect ink writiing *Direct ink writing*

DOD: Extrusão sob demandadirect ink writiing *Drop on demand*

EBM: Fusão por feixe de eletrões, do inglês *Electron beam melting*

ECM: Matriz extracelular, do inglês *extracelular matrix*

FDM: Modelaçãp de deposição fundidade, do inglês *Fused deposition modeling*

G23: Própolis do Gerês recolhido em 2023

G23.EE: Extrato etanólico de G23

IV: Infravermelhos

LBA: Meio Luria suplementado com agar, do inglês Luria *broth supplemented with agar*

LB: Meio Luria, do inglês Luria *broth*

LOX: Lisil-oxigenase, do inglês *Lysyl oxygenase*

LPCs: Polímeros de cristal líquido, do inglês *Liquid cristal polymers*

MEX: Extrusão de material, do inglês *Material extrusion*

MIC: Mínima concentração inibitória, do inglês *Minimum inhibitory concentration*

MMP9: Metaloproteínase de matriz 9, do inglês *Matrix metalloproteinase-9*

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* suscetível a meticilina

OMS: Organização mundial da saúde

PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*

PBF: Fusão em leito de pó, do inglês *Powder bed fusion*

PBS: Tampão fosfato salino, do inglês *phosphate buffered saline*

PEG: Polietilenoglicol

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *Platelet-derived growth factor*

PLA: Poliácido lático

PS: Poliestileno

PVP: Polivinilpirrolidona

ROS: Espécies reativas de oxigénio, do inglês *Reactive oxygen species*

RNS: Espécies reativas de nitrogénio, do inglês *Reactive nitrogen species*

SEM: Microscopia eletrónica de varrimento

SLA: Estereolitografia, do inglês *Stereolithografy*

SLM: Fusão a laser seletiva, do inglês *Selective laser fusion*

SLS: Sinterização seletiva a laser, do inglês *Selective laser sintering*

SqMV: Vírus do mosaico, do inglês *Squash mosaic virus*

TFT: Teor de fenóis totais

TGF-β: Fator de crescimento transformante beta, do inglês *Transforming growth factor beta*

TLRs: Recetores do tipo Toll, do inglês *Tool like receptors*

TOT: Teor de orto-difenóis totais

TPT: Teor de polifenóis totais

TRIQP: Regulamento técnico de identidade e qualidade do própolis, do inglês *Technical regulation of propolis identity and quality*

UFC: Unidades formadoras de colónias

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Ultravioleta Visível

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *Vascular endothelial growth factor*

VPP: Fotopolimerização vat, do inglês *Vat photopolymerezation*

YPDA: Meio de levedura peptose dextrose suplementado com agar, do inglês *Peptose dextrose yeast broth supplemented with agar*

YPD: Meio de levedura peptose dextrose, do inglês *Peptose dextrose yeast broth*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Constituição da pele e segmentação das camadas constituintes da epiderme. Retirado de Boas, (2024) 2

Figura 2: Sinalização celular durante a fase de homeostasia no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Formação do coágulo de interrupção de sangramento, ação das plaquetas e seus fatores de crescimento. Adaptado de Jacob *et al.*, (2015) 5

Figura 3: Sinalização celular durante a fase inflamatória no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Ação dos macrófagos, neutrófilos, neutrófilos e monócitos, iniciando-se a resposta inflamatória da pele. Adaptado de Jacob *et al.*, (2015) 6

Figura 4: Infeção numa lesão cutânea causada por bactérias formadoras de um biofilme. A ação deste biofilme impede que os macrófagos e compostos ativos nas terapias tradicionais consigam agir a fim de eliminar a infeção. Adaptado de Biofilms Made Easy 2010. Wounds International 8

Figura 5: Sinalização celular durante a fase proliferativa no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Formação do tecido granuloso e ação dos queratinócitos. Adaptado de Jacob *et al.*, (2015) 9

Figura 6*:* Sinalização celular durante a fase de remodelação no processo de cicatrização de lesões cutâneas, formação de colagénio tipo III e diferenciação de miofibroblastos. Adaptado de Jacob *et al.*, (2015)..... 11

Figura 7*:* Terapias convencionais usadas para o tratamento de lesões cutâneas , as suas respetivas formas de aplicação e ação no processo de cicatrização cutânea. Adaptado de Pereira & Bártolo, (2016)..... 13

Figura 8: Aplicação de um curativo previamente mergulhado em mel para o tratamento de feridas cutâneas. Retirado de Honey for Wound Healing – Unit Plan, (2024) 15

Figura 9: (**A**) Própolis vermelho (Brasil), (**B**) própolis europeu ou do tipo choupo e (**C**) própolis verde (Brasil)..... 20

Figura 10: A - Ação do fungo *Hemileia vastatrix* numa plantação de café, retirado de Canestri, (2020); **B** – Ação do fungo *Cercospora coffeicolla* numa plantação de café, retirado de Canestri, (2020) 32

Figura 11: Mecanismo molecular do efeito protetor mediado por própolis durante o stresse oxidativo em lesões cutâneas. Adaptado de Oryan *et al.*, (2018) 33

Figura 12: Primeira peça produzida por SLA em 1983. Adaptado de Wong & Hernandez, (2012) 34

Figura 13: Classificação dos tipos de manufatura aditiva. Adaptado de Jadhav & Jadhav, (2022) 36

Figura 14: Esquema representativo da impressão por jato de tinta. Adaptado de Agarwala, (2016) 37

Figura 15: Esquema representativo da impressão por extrusão. Adaptado de Agarwala, (2016) 38

Figura 16: Esquema representativo da impressão por microválvulas. Adaptado de Agarwala, (2016) 39

Figura 17: Esquema representativo da impressão por laser. Adaptado de Agarwala,(2016) 45

Figura 18: Camadas formadas após aquecimento da amostra de G23 com dH_2O e posterior arrefecimento. **A**: cera; **B**: água e **C**: própolis livre de cera 47

Figura 19: Representação esquemática do ensaio antimicrobiano para obtenção dos valores de MIC relativos ao G23.EE com as resPSivas réplicas e ensaios independentes realizadas para cada microrganismo. **R1,R2,R3** representam as réplicas e **E1,E2** e **E3** representam os ensaios independentes..... 51

Figura 20: Representação esquemática do processo de preparação da bio tinta para impressão. **A**: Preparação da solução de própolis com AA (0,5%) e banho de ultrassons **B**: Soluções após banho de ultrassons **C**: incorporação do quitosano na solução e agitação 52

Figura 21: Soluções de G23.EE usadas para impressão dos filmes poliméricos. **A**: 0,08 g/mL; **B**: 0,16 g/mL; **C**: 0,30 g/mL; **D**: 0,50 g/mL 53

Figura 22: As quatro bio tintas usadas para testes de impressão após otimização. **A**: 0,08 g/mL; **B**: 0,16 g/mL; **C**: 0,30 g/mL; **D**: 0,50 g/mL 53

Figura 23: Representação esquemática da impressora usada para impressão das amostras 54

Figura 24: Esquema de funcionamento da técnica SEM. Retirado de Technology Network Website 55

Figura 25: Esquema representativo do funcionamento de ATR-FTIR. Retirado de Ausili *et al.*, (2015) 56

Figura 26: Representação ilustrativa das alterações visíveis de uma das amostras ao longo do ensaio de swelling. Amostra (**A**) antes do ensaio; (**B**) submersa em meio líquido; (**C**) depois de retirada do meio e seca pronta para pesagem 57

Figura 27: Equipamento (Linkam) utilizado para a realização dos ensaios de tração com célula de carga de 20 N. Nas imagens encontra-se assinalado com setas o local de inserção da amostra para análise..... 58

Figura 28: Esquema representativo do ensaio de UV-Vis. Retirado de S. Han, (2019) 59

Figura 29: Representação de uma das placas do ensaios por halo de inibição. **A**: amostra com o seu respetivo halo de inibição; **B**: controlo com EtOH 100%; **C**: controlo com G23.EE 63

Figura 30: Extrato G23.EE após secagem no evaporador rotativo 71

Figura 31: Filmes impressos através da adição de G23.EE gota a gota em agitação magnética cujos aglomerados de própolis cristalizados se encontram devidamente identificados com setas 71

Figura 32: Misturas de 5% de G23.EE (nas concentrações 0,08 g/mL (**A**); 0,16 g/mL (**B**) e 0,50 g/mL (**C**) com AA (0.5%) após sonicação 72

Figura 33: Impressão de filmes com 3% Ch, 0.5% AA e 7,5% G23.EE (**A**: 0,08g mL; **B**: 0,16 g/mL; **C**: 0,30 g/mL e **D**: 0,50 g/mL) 73

Figura 34: Filmes obtidos por DIW de quitosano (3%), AA (0.5%) e G23.EE (**A**: 2,5%) (**B**:7,5%) (**C**: 10%)..... 74

Figura 35: Espetro de FTIR-ATR das amostras de G23.EE liofilizado, amostra bruta de G23, filme com 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE; filme com 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; filme com 3% Ch + 0,5% AA + 2,5% G23.EE e filme com 3% Ch + 0,5% AA, respetivamente de cima para baixo 77

Figura 36: Representação gráfica das pesagens do ensaio de *swelling* com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de PBS 1% (*v/v*). **A**) pesagens do ensaio até as 7h **B**) pesagens do ensaio completo durante as 24h 80

Figura 37: Representação gráfica das pesagens do ensaio de *swelling* com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de dH_2O. **A**) pesagens do ensaio até as 7h **B**) pesagens durante os 21 dias de ensaio 81

Figura 38: Comparação das amostras antes do ensaio: **A1**) 3% Ch + 0,5% AA; **B1**) 3% Ch + 0,5% AA + 2,5% G23.EE; **C1**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **D1**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE com as amostras ao fim de 24 h de ensaio em contacto com o meio PBS 1% (*v/v*): **A2**) 3% Ch + 0,5% AA; **B2**) 3% Ch + 0,5%

AA + 2,5% G23.EE; **C2**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **D2**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE 82

Figura 39: Comparação das amostras antes do ensaio: **A1**) 3% Ch + 0,5% AA; **C1**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **D1**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE com as amostras ao fim do ensaio em contacto com dH_2O: **A3**) 3% Ch + 0,5% AA; **C3**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **D3**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE 83

Figura 40: Representação gráfica das pesagens ensaio de degradação com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de PBS 1% (*v/v*) 85

Figura 41: Representação gráfica das pesagens ensaio de degradação com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de dH_2O 85

Figura 42: Comparação da alteração das amostras depois do ensaio em dH2O **A4**) 3% Ch + 0,5% AA; **B4**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **C4**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE com as amostras depois do ensaio em PBS: **A5**) 3% Ch + 0,5% AA; **B5**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **C5**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE 86

Figura 43: Representação gráfica do ensaio de tensão/deformação na amostra de 3% Ch + 0,5% AA, foram feitas 3 réplicas (1,2 e 3) 88

Figura 44: Representação gráfica do ensaio de tensão/deformação na amostra de 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE, foram feitas 3 réplicas (1,2 e 3) 88

Figura 45: Representação gráfica dos valores de absorvância dos filmes 3% Ch + 0,5% AA (**azul**) e 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE (**laranja**) ao feixe de luz UV-Vis 90

Figura 46: Resultado do ensaio por halo de inibição do filme com 7,5% G23.EE. **A**) Filme **B**) Controlo G23.EE **C**) Controlo EtOH 100% 91

Figura 47 e **48**: Resultados de duas réplicas do ensaio por halo de inibição no filme com 10% G23.EE. **A**) Filme; **B**) Controlo G23.EE; **C**) Controlo EtOH 100% 92

Figura 49: Representação gráfica dos resultados do ensaio por *contact killing* de amostras com 0% G23.EE (Ch puro); 2,5% G23.EE; 7,5% G23.EE e 10% G23.EE 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Materiais comercialmente disponíveis para o tratamento de diferentes tipos de lesões cutâneas..... 17

Tabela 2: Comparação de diferentes tipos de própolis, a sua origem geográfica, fonte botânica e composição química 27

Tabela 2 (continuação): Comparação de diferentes tipos de própolis, a sua origem geográfica, fonte botânica e composição química 28

Tabela 3: Exemplos de trabalhos de investigação desenvolvidos com base na impressão 3D de produtos com quitosano 42

Tabela 4: Teor balsâmico, humidade, de cinzas e ceras da amostra de própolis G23. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP)* ($p<0.05$). * $n \geq 3$, ou seja, para cada um dos resultados apresentados foram realizadas pelo menos 3 réplicas do ensaio de caracterização do G23..... 61

Tabela 5: Conteúdo total de polifenóis (TPT), flavonóides (TFT) e de orto-difenóis (TOT) determinado para o G23.EE 65

Tabela 6: Atividade de eliminação de radicais livres do G23.EE. Os resultados expressos em EC_{50} (μg/mL) como média ± DP ($n \geq 3$). O ácido gálico foi usado como padrão para o ensaio de DPPH..... 67

Tabela 7: Valores de MIC (μg/mL) do G23.EE frente ao painel de microrganismos selecionados como indicadores de suscetibilidade. Para cada estirpe foram realizadas 3 réplicas com 3 ensaios independentes cada um 68

Tabela 8: Representação do cálculo da percentagem de *swelling*, ganho de massa das amostras ao longo do tempo dos ensaios 82

Tabela 9: Representação do cálculo da percentagem de perda de massa, das amostras ao longo do tempo dos ensaios 86

Tabela 10: Média das medições dos halos de inibição dos ensaios com as amostras 3% quitosano + 0,5% AA + 10% G23.EE 92

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

1. A importância da pele e da manutenção da sua integridade

A pele constitui o maior órgão do corpo humano, pesa cerca de 3,6 kg em adultos e representa a primeira linha de defesa do organismo, estando organizada em várias camadas distintas. Este órgão tem uma estrutura complexa e hospeda dezenas de populações celulares que interagem entre si com o principal objetivo de construir e manter a barreira entre o meio interno e o externo, a homeostasia (Kottner *et al.*, 2019; Uchida & Bruschi, 2023).

Entre as várias camadas da pele, a que se localiza mais externamente é a epiderme, seguida da derme e, ainda, a hipoderme (Stephen-Haynes, 2008; Gilaberte *et al.*, 2016). A epiderme encontra-se perpetuamente em regeneração, com um tempo de renovação celular de aproximadamente dois meses. Os queratinócitos representam 80% das células nesta camada e diferenciam-se em corneócitos, num processo denominado queratinização. São ricos em queratina e maioritariamente responsáveis pela permeabilização da pele e consequente manutenção da homeostasia (Gilaberte *et al.*, 2016). A segunda camada da pele, a derme, é um tecido fibroso e elástico que dá suporte e estrutura a este órgão. É constituída por duas camadas e ambas são maioritariamente formadas por fibras de colagénio, no entanto reconhecem-se outros tipos de células como fibroblastos, fibrócitos, células correlacionadas com a manutenção da estrutura de vasos sanguíneos e linfáticos e, ainda, outras populações celulares responsáveis pela resposta imunitária do sistema linfático. Os vasos sanguíneos e linfáticos são responsáveis por providenciar nutrientes para a pele e regular o funcionamento de processos imunológicos (Braverman, 1989; Gilaberte *et al.*, 2016). É também na derme que se encontram presentes múltiplos tipos de fibras musculares venosas ou arteriais, corpos glómicos envolvidos na regulação da temperatura corporal e, ainda, músculos responsáveis pela contração dos folículos de pelo, sendo estes músculos involuntários. Os músculos voluntários encontram-se, por sua vez, na superfície da face, sendo responsáveis por expressões faciais. Nesta mesma camada cutânea encontram-se os mastócitos, células multifuncionais importantes na resposta imunitária adaptativa ou inata da pele através da secreção de citocinas e quimiocinas. Os nervos estão igualmente presentes na derme e são de extrema importância pela sua capacidade sensorial, possibilitando o organismo de percecionar o toque, temperatura, dor e comichão (Weddell, 1945; Lippert *et al.*, 2004; Gilaberte *et al.*, 2016). Por fim, a camada mais interna da pele é a hipoderme, cujas funções incluem a cicatrização cutânea, preservação da energia homeostática, regulação da temperatura corporal, lubrificação mecânica e conexão dos tecidos (Wong *et al.*, 2016).

A pele (Figura 1) tem uma relevância distinta pelas suas funções, atuando como termorregulador, produtor de vitamina D, percetor sensorial, barreira protetora contra danos mecânicos, ambientais, internos, externos e, ainda, microbianos (Qu *et al.*, 2018; Kottner *et al.*, 2019). Este órgão regula ainda a manutenção da humidade do seu hospedeiro garantindo a preservação de um ambiente suficientemente oclusivo e que auxilia a conservação da integridade do próprio órgão como um todo (Cork 1997; Stephen-Haynes, 2008).

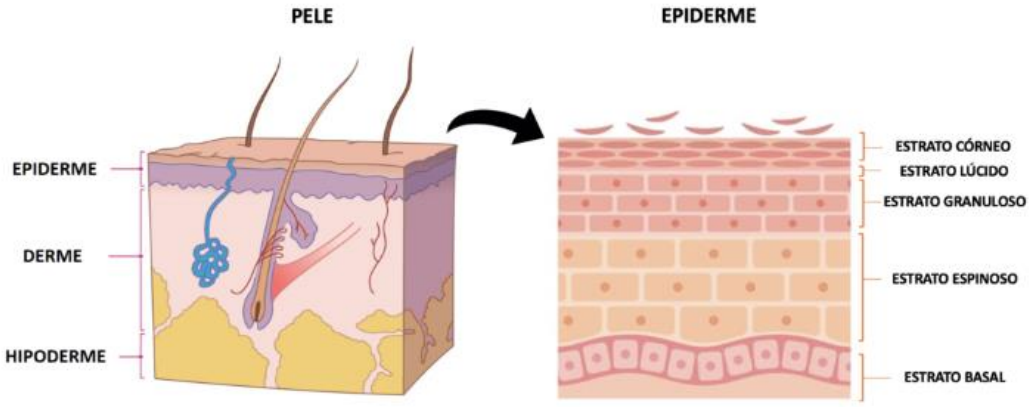


Figura 1: *Constituição da pele e segmentação das camadas constituintes da epiderme. Retirado de Boas (2024)*

Para que as várias funções da pele se mantenham é necessária a sua conservação. Vários fatores são capazes de deteriorar esta barreira natural, quer mecanicamente ou por interação direta com químicos (solventes, detergentes, ácidos, entre outros). Entre a variabilidade de danos existentes, salienta-se a divisão entre danos internos (idade do indivíduo, obesidade, patologias sistémicas (*diabetes mellitus*, por exemplo), predisposição genética, entre outros) e danos externos (exposição solar, tabagismo, poluição aérea, fricção, pressão, entre outras) (Stephen-Haynes, 2008; Kottner *et al.*, 2019). Para evitar danos a pele desenvolveu capacidades defensivas que podem ser classificadas em físicas, térmicas, imunitárias, Ultra Violeta (UV), oxidantes, antimicrobianas ou de permeabilidade dependendo da sua função. Esta capacidade de adaptação a danos tem vindo a ser alvo de investigação ao longo do tempo (Lee *et al.*, 2006).

Entre as várias estratégias de defesa destaca-se o papel da epiderme, responsável por expressar diferentes moléculas cuja ação se insere na resposta de defesa da pele, como mediadores inflamatórios secretados por queratinócitos, fulcrais para as respostas de defesa térmica e UV (Ghoreishi, 2000; Hearing, 2005; Lee *et al.*, 2006; Albanesi & Pastore, 2010). A libertação imediata de lípidos constituintes da epiderme quando exposta a químicos nocivos, e que levam a acidificação da superfície cutânea, é outro exemplo de estratégia adaptativa da pele (Feingold *et al.*, 2007; Brenner & Hearing, 2008). Adicionalmente, o contacto cutâneo constante com substâncias perigosas leva a um "efeito de endurecimento" como forma de resposta protetora e preventiva (Park *et al.*, 2014). É ainda de salientar a própria inflamação como resposta fisiológica básica da pele, que ocorre como consequência de uma infeção (Stephen-Haynes, 2008; Park *et al.*, 2014).

No que concerne à resposta de defesa antimicrobiana, o sistema responsável por esta função é maioritariamente mediado por lipídios superficiais da pele que levam à acidificação da superfície cutânea, conforme referido anteriormente, (impedindo o desenvolvimento e proliferação microbiana no local), produção de proteínas e péptidos antimicrobianos, entre outros (Bowdish *et al.*, 2005). Pode ainda acrescentar-se que, dependendo do tipo de ameaça microbiana, a pele detém a capacidade de acionar diferentes mecanismos de combate a este stresse (Bowdish *et al.*, 2005).

Alguns estudos (Hiemstra *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2024) indicam que a capacidade de defesa dos péptidos antimicrobianos recorre a mecanismos distintos, incluindo alteração da expressão genética do seu hospedeiro, ação como quimiocinas (mediadores e reguladores da inflamação, da família das citotinas), inibição da produção de citotinas pró-inflamatórias e, ainda, a promoção da cicatrização de feridas (caso exista lesão cutânea) através da modulação de células dendríticas e da resposta imune adaptativa (Bowdish *et al.*, 2005). Os modelos *in vitro* e *in vivo* usados indicam que os péptidos associados à resposta antimicrobiana são cruciais para a prevenção e eliminação de inflamações em feridas cutâneas. Sendo a própria infeção uma das maiores e mais intrínsecas ameaças ao processo normal de cicatrização das lesões cutâneas, a manutenção da capacidade antimicrobiana deve ser uma das principais preocupações (Mcphee & Hancock, 2005; Hemshekhar *et al.*, 2016).

A capacidade de compensação da pele aos riscos à qual é exposta pode ser referida como capacidade funcional, tendo sido inicialmente conceptualizada no contexto de envelhecimento (Stephen-Haynes, 2008). No entanto, os mecanismos de resposta nem sempre são suficientes para uma recuperação total deste órgão, sendo esta uma complicação muito usual, levando à restruturação incompleta da pele (Ibrahim *et al.*, 2022). A disrupção da uniformidade desta barreira essencial à homeostasia acarreta consequências devastadoras no seu hospedeiro, sendo a resposta inflamatória causada por infeções uma problemática habitual, resultando consequentemente no enfraquecimento do sistema imunitário e desequilibrando por completo o desempenho do organismo vivo (Stephen-Haynes, 2008; Park *et al.*, 2014). A dificuldade ou impossibilidade de recuperação da estrutura normal da pele em lesões cutâneas deve-se tanto à complexidade do órgão como do próprio processo de cicatrização. Assim, é importante salientar tanto a relevância desta da problemática das lesões cutâneas, como as fases de cicatrização deste processo e em que consiste cada uma delas.

2. Feridas cutâneas: uma problemática complexa e universal

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo bioquímico lento e complexo, frequentemente associado a uma das maiores preocupações da saúde pública (Schreml *et al.*, 2010; Balderas-Cordero *et al.*, 2023; Kapare *et al.*, 2023). Estima-se que, em 2018, o número de pessoas no mundo com lesões cutâneas rondou os 8,2 milhões, com custos de fármacos para o seu tratamento que ascenderam a 96,8 mil milhões de dólares, tendo já sido estimado um aumento no valor de 15 a 22 mil milhões de dólares no ano de 2024 (Vela-Anaya *et al.*, 2018; Balderas-Cordero *et al.,* 2023; Kapare *et al.,* 2023). Só no continente Europeu cerca de 1% da população é afetada com a patologia de feridas cutâneas crónicas (Schreml *et al.*, 2010). A morbilidade associada ao atraso no seu tratamento impõe enormes impactos na saúde pública, tanto a nível económico como psicológico (Uchida & Bruschi, 2023).

A necessidade de aperfeiçoar as terapias já existentes e, ademais, colmatar as suas desvantagens fomentam o desenvolvimento de novas terapias focadas em melhorar a resposta antimicrobiana em caso de lesão cutânea, condição crucial e indispensável para que o processo de cicatrização ocorra normalmente (Sørensen *et al.*, 2003; Bowdish *et al.*, 2005).

2.1. Fases de cicatrização de uma ferida cutânea

O processo de cicatrização de feridas cutâneas ocorre com base em mecanismos contínuos e coordenados entre si que se dividem maioritariamente em três fases distintas: inflamação, proliferação e remodelação. Alguns autores ressaltam ainda a importância de um período inicial de homeostasia (Uchida & Bruschi, 2023; Wilkinson & Hardman, 2023). Estes processos, sequencialmente apresentados e representados nas Figuras 2, 3, 4 e 5 requerem formas de sinalização altamente organizadas entre os vários tipos de células participantes e os seus produtos de ação. Estes, por sua vez, são responsáveis pela consequente sinalização da ação de fatores de crescimento, citocinas, colagénio, entre outros (Jacob *et al.*, 2015; Balderas-Cordero *et al.*, 2023).

2.1.1. Homeostasia

A primeira fase de cicatrização é marcada pela interrupção do sangramento por ativação das plaquetas. Nesta fase forma-se a fibrina (coágulo) no local da ferida cutânea que restaura a homeostasia, momento em que as plaquetas atuam captando células do sistema imunitário e/ou pela secreção de fatores de crescimento que estimulam outras células da pele como fibroblastos (Figura 2) (Golebiewska & Poole, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019; Uchida & Bruschi, 2023). Este coágulo insolúvel de fibrina e trombina, (proteína responsável pela formação da fibrina) tem várias funções secundárias importantes, incluindo proteção mecânica e química (através da expressão de recetores que regulam a produção de péptidos antibacterianos, TLRs -do inglês *tool like receptors*), atua estruturalmente para suporte das células imunológicas e é ainda um "reservatório" para os fatores de crescimento secretados e que irão orientar o comportamento das células danificadas numa fase inicial (Wilkinson & Hardman, 2023).

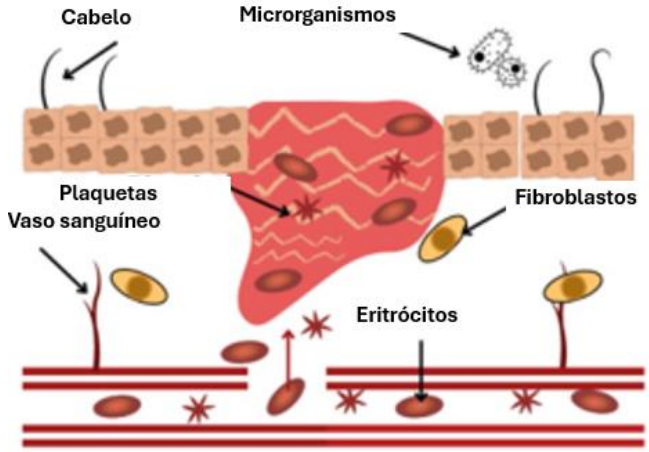


***Figura 2**: Sinalização celular durante a fase de homeostasia no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Formação do coágulo de interrupção de sangramento. Fase em que se dá a ação das plaquetas e seus fatores de crescimento. Adaptado de Jacob et al., (2015)*

Quando é formado um coágulo suficientemente funcional o processo de coagulação é interrompido, prevenindo trombose excessiva (Kingsley *et al.*, 2002; Wilkinson & Hardman, 2023). A primeira fase de cicatrização termina com a reparação da parede do vaso sanguíneo deteriorado através da libertação do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, do inglês *platelet-derived growth factor*) (Kingsley *et al.*, 2002).

2.1.2. Inflamação

A segunda fase do processo de cicatrização inicia-se imediatamente após o dano, pela sinalização molecular dos DAMPs (padrões moleculares associados a danos, do inglês *damage associated molecular pattern*) e PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos, do inglês *pathogen associated molecular pattern*). Estes dois tipos de sinalizadores moleculares ativam mastócitos, células do sistema imunitário que iniciam o processo de pró-inflamação (Wilkinson & Hardman, 2023), dirigindo-se para a lesão e, simultaneamente, libertando substâncias que aumentam a permeabilidade vascular como resposta defensiva da ferida (Li & Guo, 2018; Uchida & Bruschi, 2023).

Ainda no processo inflamatório, e no local da lesão cutânea, inicia-se a formação de novo tecido através da ação direta de vários tipos distintos de células inflamatórias como linfócitos, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e macrófagos. Todas estas células são responsáveis pela remoção de tecido danificado e produção de citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas que funcionam como estímulos preparatórios para a formação de novo tecido cutâneo exercendo, simultaneamente, um papel de proteção contra a ação de microrganismos externos (Figura 3) (Schreml *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2020; Uchida & Bruschi, 2023).

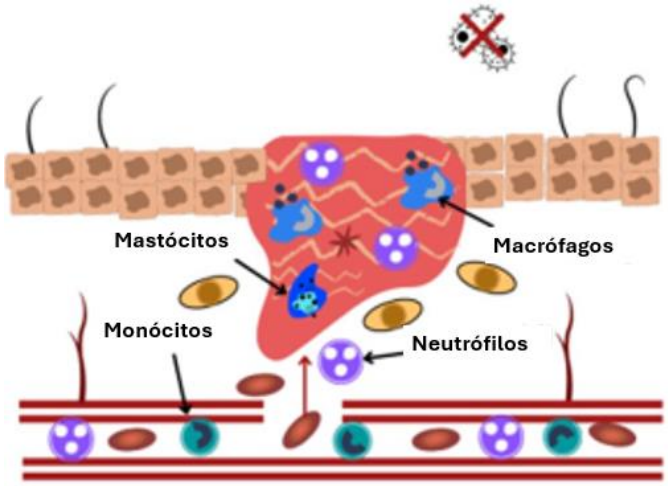


Figura 3: *Sinalização celular durante a fase inflamatória no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Fase em que é denotada a ação dos macrófagos, neutrófilos, neutrófilos e monócitos inicia a resposta inflamatória da pele. Adaptado de Jacob et al., (2015)*

A inflamação descontrolada e excessiva é a principal causa do atraso na cicatrização e, consequentemente, a característica mais comum de lesões cutâneas crónicas (Wilkinson & Hardman, 2023). Por outro lado, uma resposta insuficiente das células imunitárias também dificulta o processo de reparação (Lin *et al.*, 2011). Desta forma, a resposta das células imunitárias deve ser situacional, aumentando para responder adequadamente à infeção, mas libertando-se eficazmente para permitir a resolução da ferida. Por conseguinte, quaisquer tratamentos para este tipo de patologia devem auxiliar a cicatrização sem nunca comprometer o equilíbrio que o funcionamento da resposta inflamatória requer (Wilkinson & Hardman, 2023).

A fase inflamatória é considerada a fase mais comprida e mais complexa de todo o processo, já que se inicia aquando do momento da lesão e tem como principal objetivo impedir a ação de microrganismos capazes de infetar o local de lesão (Schreml *et al.*, 2010; Xue & Jackson, 2015; Rutter, 2018; Xu *et al.*, 2020). A infeção de lesões cutâneas pela ação de microrganismos externos é ainda reconhecida como a segunda maior fonte de infeções nosocomiais (bacterianas ou fúngicas), um dos maiores desafios da medicina atual, dado estarem associadas ao aumento da mortalidade e morbilidade e a um elevado impacto socioeconómico (Owens & Stoessel, 2008). O conhecimento dos microrganismos mais associados a estas infeções em lesões cutâneas e o seu modo de ação são fundamentais para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas e antimicrobianas eficazes (Bessa *et al.*, 2015; Rutter, 2018; Williams, 2021).

2.1.3. Infeções microbianas: estirpes associadas, modo de ação e consequências

Quando a barreira cutânea se encontra comprometida existe um risco de entrada de bactérias, leveduras, fungos e/ou vírus capazes de causar infeção no local (Young, 2012). Após entrada dos microrganismos no ambiente interno da pele estes tornam-se capazes de se desenvolver, multiplicar e danificar o tecido exposto, podendo impedir o processo normal de cicatrização cutânea. Se o local não for reconhecido, e devidamente tratado como infecionado, os tecidos que o rodeiam podem ser afetados e levar a uma infeção sistémica e, posteriormente, a uma lesão crónica no hospedeiro (Rutter, 2018). Um aumento localizado de temperatura, vermelhidão, inflamação, exsudatos, odor, dor, entre outros, indiciam uma infeção local, quando a infeção se torna sistémica, outros sintomas como febre, taquicardia ou letargia tornam-se evidentes. Se a infeção alcançar ainda uma fase crónica, os sintomas são ainda mais agravados podendo ocorrer a descoloração completa do tecido lesionado ou sangramento em forma de granulado, entre outros (Ousey *et al.*, 2013; Lipsky *et al.*, 2016).

Entre os vários microrganismos patogénicos capazes de despoletar uma reação infeciosa destacam-se como mais comumente encontrados bactérias Gram-positivo (Mengesha *et al.*, 2014; Bahçeci, 2020). No entanto, todas as infeções microbianas em lesões cutâneas são designadas como polimicrobianas (causadas por vários tipos de microrganismos), considerando-se as mais comuns *Staphylococcus aureus, Streptototcus pyogenes, Enterococci faecalis , Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* e, mais recentemente, *Staphylococcus epidermidis* (Solanki & Nagori, 2013; Bahçeci, 2020). Após invadirem o organismo vivo através da barreira cutânea que se encontra desprotegida, durante o processo de infeção microbiana, os microrganismos são capazes de formar um biofilme no local da lesão, estrutura que os protege física e quimicamente, nomeadamente dos tratamentos aplicados no próprio local (Figura 4).

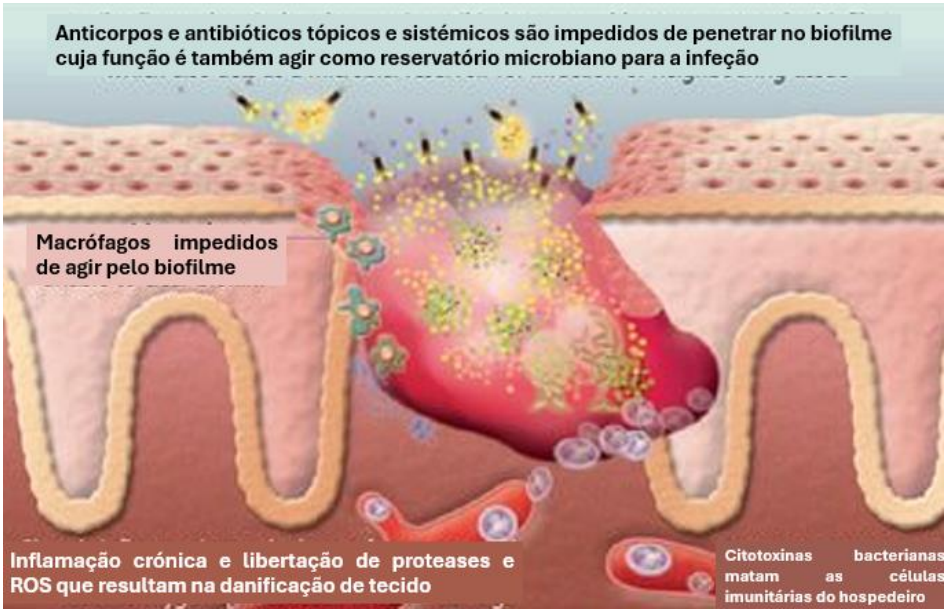


Figura 4: *Infeção numa lesão cutânea causada por bactérias formadoras de um biofilme. A ação deste biofilme impede que os macrófagos e compostos ativos nas terapias tradicionais consigam agir a fim de eliminar a infeção. Adaptado de Biofilms Made Easy Wounds International (2010).*

A identificação correta do(s) microrganismo(s) presentes no local de lesão causador(es) da infeção e respetiva suscetibilidade a agentes antimicrobianos aumenta consideravelmente a possibilidade de sucesso do tratamento aplicado, sendo, desta forma, crucial reconhecer as capacidades antimicrobianas (o seu espetro de ação, a dose necessária para que seja eficaz, bem como o seu modo de ação) das terapias que se pretendem aplicar (Solanki & Nagori, 2013; Cirit *et al.*, 2014).

As estratégias terapêuticas a nível farmacológico mais usadas para travar as infeções microbianas são antissépticos e, maioritariamente, antifúngicos e antibióticos (Gurtner *et al.*, 2008; Schreml *et al.*, 2010; Pereira & Bártolo, 2016). O uso excessivo deste último tipo de terapia tem contribuído para a emergência de patógenos multi-resistentes a antibióticos, antissépticos, antifúngicos, entre outros. Trata-se de um desafio atual e mundial, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), com grande impacto nos sistemas de saúde, dado que os tratamentos atuais acabam por se tornar ineficazes (Mohammed *et al.*, 2022).

Estudos sobre microrganismos isolados de lesões cutâneas (Bessa *et al.*, 2015; Bahçeci, 2020; Arooj *et al.*, 2023) indicam *S. aureus* como sendo a bactéria Gram-positivo mais encontrada, presente em até 66% do total das lesões cutâneas estudadas, seguida de *Escherichia coli,* bactéria Gram-negativo detetada em, pelo menos, 48,1% (Mohammed *et al.*, 2022). A maioria dos isolados das bactérias Gram-positivo demonstrou sensibilidade a antibióticos como meropenem, ciprofloxacina e gentamicina (Mohammed *et al.*, 2022) e ampicilina, amoxicilina e piperacilina para as bactérias Gram-negativo (Bessa *et al.*, 2015). Os

diversos estudos sobre a complexidade da infeção em lesões cutâneas, as estirpes microbianas mais usuais e a sua suscetibilidade têm permitido concluir que a dose de fármaco necessária para alcançar a morte celular dos microrganismos causadores de infeções é totalmente dependente do tipo de infeção, a sua extensão, o tipo(s) de fármado(s) usado(s), bem como do paciente, tornando-se muitas vezes excessiva, causando ainda toxicidade em tecidos vizinhos saudáveis e efeitos secundários a longo prazo (*e.g.* acumulação dos fármacos no organismo) (Sherchan & Gurung, 2018; Afroz *et al.*, 2020; Mohammed *et al.*, 2022). Deste modo, terapias dirigidas principalmente contra as estirpes mais encontradas em contexto de infeção cutânea e cuja dose terapêutica eficaz seja a menor possível são fundamentais para permitir que o processo normal de cicatrização ocorra (Wilkinson & Hardman, 2023).

2.1.4. Proliferação

A fase proliferativa é caracterizada pela extensa ativação de queratinócitos (Figura 5), macrófagos e pela finalização da substituição dos tecidos danificados por fibroblastos e células epiteliais. Ocorre normalmente a partir do terceiro dia até aproximadamente à terceira semana pós lesão; no entanto, os queratinócitos são ativados logo após 12 h de alterações mecânicas na pele, exposição a peróxido de hidrogénio, patógenos, fatores de crescimento e citocinas (Li & Guo, 2018; Tottoli *et al.*, 2020; Negut *et al.*, 2020; Uchida & Bruschi, 2023; Wilkinson & Hardman, 2023).

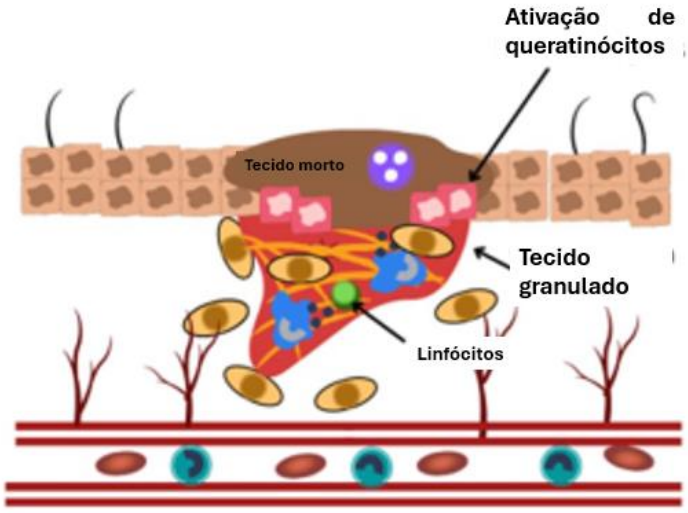


Figura 5: *Sinalização celular durante a fase proliferativa no processo de cicatrização de lesões cutâneas. Formação de tecido granuloso, fase em que é relatada a ação dos queratinócitos. Adaptado de Jacob et al., (2015)*

A migração e proliferação dos fibroblastos e queratinócitos para o local da lesão é crucial nesta fase por serem responsáveis pela secreção de uma nova matriz extracelular (ECM, do inglês *extracelular matrix*) (Wager & Leavesley, 2015; Komi *et al.*, 2020). Durante o processo de formação da ECM, quando os queratinócitos de extremidades opostas da ferida se unem, a migração dos fibroblastos termina, sendo, portanto, estabelecida uma nova camada epitelial fina (Kirsner, 2005; Wilkinson & Hardman, 2023).

Para que seja formada uma nova ECM são necessários diferentes tipos de fibroblastos. Estas células respondem à presença de vários tipos de moléculas de sinalização de plaquetas, células endoteliais e macrófagos. A diferenciação no seu modo de ação deve-se à existência de duas linhagens distintas de fibroblastos, uma que auxilia na reepitelização e outra que contribui para a deposição da ECM (Driskell *et al.*, 2013; Wilkinson & Hardman, 2023). Os fibroblastos são os principais responsáveis pela degradação da antiga ECM e sua subsequente substituição por tecido granuloso rico em fibronectina, colagénio tipo III e proteoglicanos (responsáveis pela formação do colagénio tipo I) (Xue & Jackson, 2015). Após deposição da nova ECM inicia-se a fase responsável pela produção de novos vasos e capilares sanguíneos - a angiogénese -, dependente da ação dos macrófagos. Este processo garante um fornecimento de corrente sanguínea adequado para o tecido recentemente formado, considerando-se, nesta fase, que o preenchimento da ferida cutânea está terminado (Figura 5) (Yeh *et al.*, 2017; Bhubhanil *et al.*, 2021).

2.1.5. Remodelação

A remodelação é considerada a última fase do processo de cicatrização de uma ferida cutânea e ocorre maioritariamente desde a terceira semana até ao primeiro ano após lesão (Uchida & Bruschi, 2023).

Nesta fase, os proteoglicanos atuam como condutores para a migração celular, formam ligações no colagénio tipo III nos locais onde antes haviam sintetizado colagénio do tipo I (Schultz & Wysocki, 2009). A composição em colagénio da pele de um adulto sem lesões cutâneas é de, aproximadamente, 80% colagénio tipo I e 10% de colagénio tipo III. Em contraste, no tecido granuloso inicialmente formado após a lesão está predominantemente presente o colagénio tipo III, em 30%, e apenas 10% de colagénio tipo I (Witte & Barbul, 1997; Wilkinson & Hardman, 2023). Esta substituição entre o colagénio do tipo III para o tipo I durante o processo de remodelação possibilita o restabelecimento de força no novo tecido (Diegelmann & Evans, 2004).

As alterações sequenciais na constituição e degradação da ECM requerem um equilíbrio temporal controlado entre a degradação e síntese de colagénio. De forma a melhorar a elasticidade da pele, a elastina libertada durante a degradação da ECM é responsável pela reformulação das fibras elásticas (Duca *et al.*, 2004; Almine *et al.*, 2012; Wilkinson & Hardman, 2023). Mais tarde, os fibroblastos presentes

anteriormente na ECM do tecido granuloso diferenciam-se em miofibroblastos com capacidade contráctil (Figura 6) (Negut *et al.*, 2020; Uchida & Bruschi, 2023).

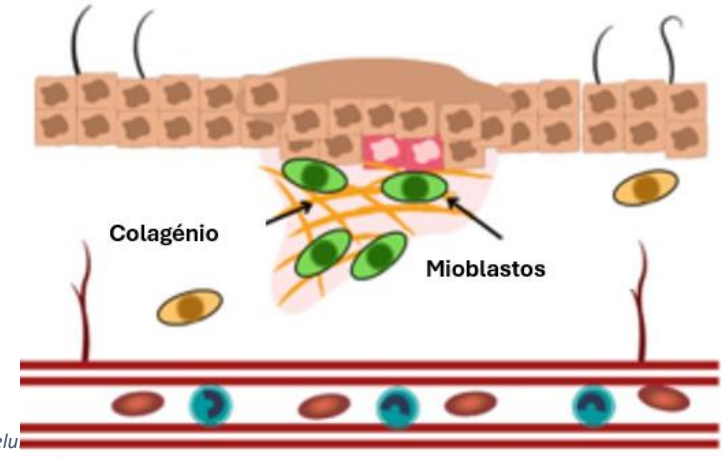


Figura 6: *Sinalização celu* *se em que se dá a formação de colagénio tipo III e diferenciação de miofibroblastos. Adaptado de Jacob et al., (2015)*

Apesar do processo de cicatrização envolvido na reparação de lesões cutâneas se iniciar praticamente no instante da sua ocorrência nem todas as feridas passam por esta cascata de processos de forma sequencial: algumas não chegam a ultrapassar a fase da inflamação, outras retornam a fases anteriores do processo e, ainda, existem casos em que a cicatriz formada não apresenta as capacidades e aspeto devidos. O tratamento aplicado em cada caso, a forma como a lesão é cuidada bem como a proveniência dos produtos aplicados durante o processo de cicatrização são fatores que podem alterar por completo a resposta da lesão ao tratamento (Witte & Barbul, 1997; Tottoli *et al.*, 2020; Uchida & Bruschi, 2023), e que importa conhecer no contexto da procura de novas alternativas terapêuticas.

2.2. Tratamentos convencionais de feridas cutâneas: limitações associadas

Apesar da capacidade natural de autorregeneração da pele humana em caso de lesão, em condições específicas - mais particularmente queimaduras profundas, perda extensiva de pele, lesões cutâneas crónicas, infeções microbianas agudas, úlceras profundas e diabetes -, esta capacidade pode ser comprometida (Gurtner *et al.*, 2008; Groeber *et al.*, 2011; Pereira & Bártolo, 2016). A ausência de tratamento, ou a sua inadequação, podem levar a lesão cutânea a um estado crónico, aumentando consideravelmente o risco de infeção e comprometendo a saúde e qualidade de vida do paciente (Li *et al.*, 2007).

Os tratamentos mais utilizados atualmente para lesões cutâneas recorrem a gazes, algodão e vários tipos de pensos rápidos. Estes materiais prometem agir como protetores da lesão, prevenindo a infeção

patogénica e outros perigos ambientais, no entanto a sua utilização torna-se, quase sempre, inadequada e ineficaz (Lee *et al.*, 2006; Pereira & Bártolo, 2016). Estes materiais absorvem os exsudatos que as feridas cutâneas libertam durante o processo de cicatrização e aderem facilmente à superfície da lesão, tornando o processo da sua remoção complexo, que pode traduzir-se em dor, desconforto e possível perda do tecido já regenerado. Em feridas crónicas, são libertados ainda maiores volumes de exsudatos, sendo tais materiais incapazes de os absorver na totalidade (Pereira & Bártolo, 2016; Han & Ceilley, 2017). O excesso de exsudatos ou a sua acumulação, num ambiente húmido, podem levar à maceração de pele saudável (Boateng *et al.*, 2008; Han & Ceilley, 2017). Ademais, apresentam elevada concentração de proteases (como pepsina e papaína), bloqueando a proliferação e atividade celulares, destruindo constituintes da matriz celular e fatores de crescimento - como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF,do inglês *basic fibroblast growth factor*) e fator de crescimento transformante beta (TGF-β, do inglês *transforming growth factor beta*) (Monteiro Lobato, 2019) -, diminuindo a velocidade do processo de cicatrização.

Grande parte dos materiais tipicamente usados atuam formando uma barreira física que impede trocas gasosas com o meio externo, aumentando gradualmente a temperatura no local da lesão, característica desvantajosa no processo de cicatrização já que um ambiente húmido e quente gera um microambiente propício à colonização microbiana e consequentes infeções (Han & Ceilley, 2017; Uchida & Bruschi, 2023). A manutenção da temperatura ambiente cutânea normal (± 25 °C) melhora visivelmente a circulação sanguínea e a migração epidérmica no local lesionado. Simultaneamente, a ocorrência de trocas gasosas (água, vapor e ar) entre a ferida e o ambiente externo são fundamentais para o desenvolvimento dos processos de angiogénese e epitelização no local da lesão (Boateng *et al.*, 2008).

Uma das primeiras preocupações no tratamento de uma lesão cutânea é a limpeza da superfície comprometida. Quando são usados os métodos de tratamento tradicionais mencionados, ainda que a superfície lesionada tenha sido limpa previamente à aplicação do material oclusivo, acumulam-se impurezas na lesão ao longo do tempo, quer através dos espaços entre o material e a pele quer pela libertação de fibras/pequenas partículas do próprio material quando em contacto com os exsudatos libertados ao longo do tempo. Tecido necrótico, corpos/materiais/partículas estranhos ao ambiente da lesão cutânea prolongam consideravelmente a fase inflamatória e servem como meio favorável ao crescimento e desenvolvimento microbiano (Boateng *et al.*, 2008; Pereira & Bártolo, 2016; Han & Ceilley, 2017).

As indiscutíveis desvantagens dos tratamento mais usados atualmente têm fomentado a procura por terapias com recurso a materiais mais adequados. Uma das maiores áreas de interesse atualmente constitui a adaptação de terapias convencionais, que tendem a ser naturais, simples e menos dispendiosas, em conjunto com abordagens mais avançadas, de forma a combinar as vantagens de ambas. Destacam-se as terapias já estudadas e utilizadas como: o uso de compostos derivados de espécies vegetais e/ou animais com inúmeras biofuncionalidades, o uso de compostos metálicos ou mesmo o recurso a organismos vivos cujos resultados se mostram, em grande parte, incontestáveis. Os exemplos mais estudados e referenciados ao longo do tempo encontram-se ilustrados na Figura 7, bem como a sua respetiva forma de aplicação (Pereira & Bártolo, 2016).

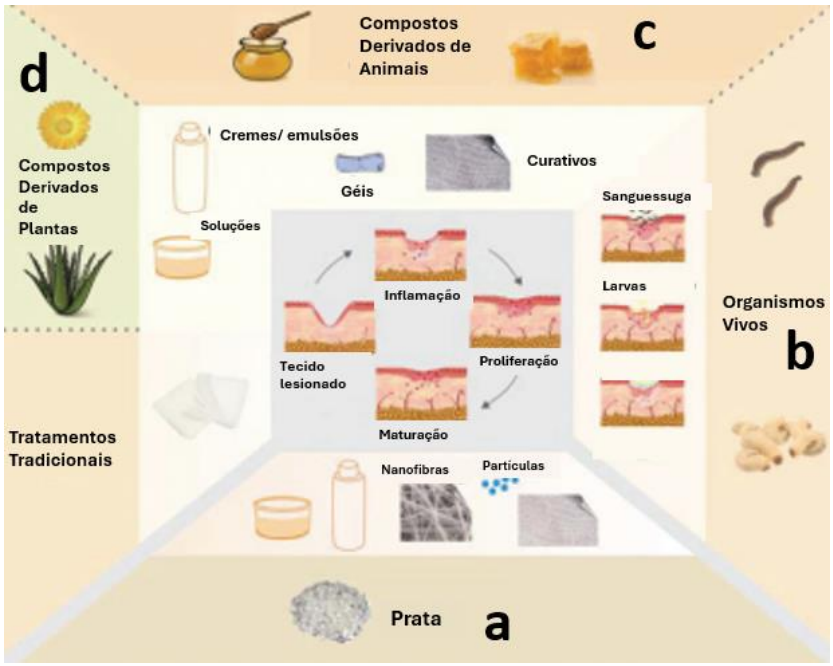


Figura 7: *Terapias convencionais usadas para o tratamento de lesões cutâneas , as suas respetivas formas de aplicação processo de cicatrização cutânea:* ***a****) Prata;* ***b****) Organismos vivos;* ***c****) Compostos derivados de animais e* ***d****) Compostos derivados de plantas. Adaptado de* Pereira & Bártolo, (2016)

A utilização de prata (Figura 7a) como composto ativo (pelo seu efeito antimicrobiano), a aplicação direta de organismos vivos (Figura 7b), que auxiliam através da remoção de tecido morto/não viável ou sangue coagulado; a aplicação de compostos derivados de animais (Figura 7c) , que apresentam redução na inflamação, nutrição tópica, redução de tecido não viável e promoção geral do processo de cicatrização ou ainda a utilização de compostos derivados de espécies vegetais (Figura 7d), que possuem atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, propriedades estimulantes celulares, antioxidantes, imunomoduladoras e promovem, de forma geral, o processo de cicatrização da lesão cutânea, são algumas das abordagens para o tratamento de feridas cutâneas que remontam há vários séculos (Pereira & Bártolo, 2016; Han & Ceilley, 2017).

Independentemente do tratamento aplicado, conforme relatado anteriormente, o primeiro passo prioriza sempre a remoção de tecido inviável e posterior exposição do tecido saudável, permitindo a sua proliferação na ferida cutânea e o alcance dos tratamentos usados. Este processo, denominado desbriamento, pode ser realizado cirurgicamente, ou através de mecanismos autolíticos ou enzimáticos (Han & Ceilley, 2017). A aplicação direta de organismos vivos (como larvas) nas lesões cutâneas com o propósito de realizar o desbriamento é uma terapia com ação mecânica e enzimática simultâneas, com capacidade de eliminar organismos patogénicos e estimular a proliferação fibroblástica (Prete, 1997; Han & Ceilley, 2017), mas atualmente considerada arcaica pela possibilidade de um desenvolvimento descontrolado dos organismos vivos no paciente, e por se tratar de um método excessivamente invasivo, oclusivo e que chega a levantar questões éticas (Boateng *et al.*, 2008).

A utilização de vários compostos derivados de espécies vegetais e/ou animais configuram dois métodos tradicionais amplamente usados no tratamento de lesões cutâneas. No que concerne aos compostos de origem vegetal, são usados sob a forma de aplicação direta das próprias espécies vegetais ou preparações das mesmas e/ou seus extratos com outros compostos que prometem estimular e acelerar o processo de cicatrização. Sendo estas formulações em forma de creme, gel, emulsão, entre outras, constituem uma das formas de terapia que mais se adequa ao tratamento de lesões cutâneas já que são formulações que não causam tanto desconforto aquando da sua remoção ou, em alguns casos, chegam a ser absorvidas na sua totalidade (Pereira & Bártolo, 2016). No entanto, quando a formulação desenvolvida não consegue ser absorvida pela pele pode, muitas vezes, gerar um ambiente consideravelmente húmido, quente e oclusivo no local da lesão, prejudicando o seu processo de cicatrização (Pereira & Bártolo, 2016). Várias espécies vegetais têm sido estudadas neste contexto (Ayyanar & Ignacimuthu, 2009; Vujanovic & Vujanovic, 2013), destacando-se a *Aloe barbadensis miller*, mais conhecida como aloé vera, *Rosmarinus officinalis L.*, vulgarmente conhecida como alecrim ou ainda *Sesamum indicum*, comumente denominado sésamo (Boudreau & Beland, 2006; Abu-Al-Basal, 2010; Shenoy *et al.*, 2011).

Relativamente aos compostos de origem animal, como o mel, própolis ou pele de sapo, entre outros exemplos, são igualmente usados pelas suas propriedades terapêuticas desde a antiguidade (Pereira & Bártolo, 2016). A maior vantagem deste tipo de recursos é a possibilidade de aproveitamento de todas as suas bioatividades num só produto, tornando o tratamento com base nestas alternativas uma abordagem altamente vantajosa, cómoda e economicamente menos dispendiosa quando comparado com a utilização de vários produtos sintéticos com diferentes propriedades, que podem ou não ser complementares (Qureshi, 2015). Por outro lado, uma das suas maiores desvantagens passa pela inconsistência das suas

características químicas e biológicas, traduzindo-se numa baixa reprodutibilidade das propriedades dos materiais/formulações em que podem ser incorporados (Pereira & Bártolo, 2016). Vários fatores cujo controlo é impossibilitado, como alterações climáticas, desflorestação, extinção de alguma espécie em particular, incêndios, perda de habitats, perda de espécies animais ou vegetais cruciais ao seu desenvolvimento, entre outros, podem estar na origem de tal variabilidade, gerando consequentemente produtos com diferentes concentrações de compostos ativos ou até diferente composição química. Estas alterações modificam consequentemente a sinergia entre os compostos de cada produto dependendo do ano de colheita, traduzindo-se em produtos finais distintos. Este é uma das maiores limitações destes produtos naturais para a sua escalabilidade industrial, e eliminar/diminuir (ou normalizar) esta diversidade é de elevada importância em termos das potenciais aplicações (Boateng *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Pereira & Bártolo, 2016).

Entre os produtos de origem animal pode salientar-se, por exemplo, o mel que é usado diretamente sobre as lesões pela sua capacidade de nutrição tópica e retenção de humidade prevenindo que a pele resseque (Figura 8) (Bodeker *et al.*, 1999). No entanto, as desvantagens do seu modo de ação, tais como a oclusão total da ferida, gerando impossibilidade de oxigenação da mesma e desenvolvimento de um ambiente contraindicado no processo de cicatrização, sobrepõem-se às suas vantagens (Boateng *et al.*, 2008; Uchida & Bruschi, 2023).



Figura 8: *Aplicação de um curativo previamente mergulhado em mel para o tratamento de feridas cutâneas. Retirado de Honey for Wound Healing – Unit Plan (2024)*

Pelo facto da maioria das terapias referidas ter como principal desvantagem a oclusão do local lesionado, impedindo a oxigenação do tecido, uma das principais prioridades no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas passa pela obtenção de um material com capacidade de proteger a lesão e promover o processo de cicatrização simultaneamente. É por isso necessário um compromisso entre a permeabilidade do material usado como tratamento e a oxigenação à qual a lesão deve ter acesso para viabilizar a

reepitelização e angiogénese (Jones *et al.*, 2006). Adicionalmente, o material ideal é capaz de absorver uma parte dos exsudatos libertados ao longo do tempo sem impedir que a superfície da lesão resseque, já que é necessária uma quantidade mínima de exsudatos na ferida para que o processo de desbriamento autolítico ocorra, dando início ao processo de cicatrização (Han & Ceilley, 2017). Na Tabela 1 apresentam-se vários tipos de materiais desenvolvidos e utilizados atualmente no tratamento de lesões cutâneas, as suas características, vantagens e desvantagens.

Tabela 1: *Materiais comercialmente disponíveis para o tratamento de diferentes tipos de lesões cutâneas, vantagens, limitações e tipo de lesão recomendada para o uso de cada uma.*

Tipo de material	Características	Tipo de lesões recomendadas	Produtos comercializados	Referências Bibliográficas
Filmes semipermeáveis	Materiais de baixa aderência, capacidade de retenção de água reduzida, permitem trocas gasosas entre o interior e exterior. Possibilitam o alojamento de patógenos às suas extremidades, atuando como suporte, impedindo a ação de antibióticos.	Recomendados para lesões sem exsudatos.	Bioclusive, Blisterfilm, Cutifilm, Tegaderm, entre outros.	Han & Ceilley, 2017
Hidrocolóides	Materiais impermeáveis à passagem de ar e normalmente mais duradouros, requerendo menos trocas durante a cicatrização.	Não recomendados em feridas infecionadas e com exsudatos.	Aquacel, Comfeel, DuoDERM, Tegasorb, entre outros.	Han & Ceilley, 2017
Hidrogéis	Materiais muito hidratantes, contribuindo para um ambiente propício à infeção e pouco absorventes. Manuseamento fácil nas trocas de material, sem causar dor nem desconforto.	Não recomendados em feridas com elevada quantidade de exsudatos.	Carrasyn, Nu-Gel, Purilon, XCell, entre outros.	Han & Ceilley, 2017
Materiais de alginato	Materiais derivados de algas, muito absorventes sendo frequentemente associados ao desenvolvimento de uma superfície da lesão muito seca e dificuldade na cicatrização.	Recomendados para lesões com elevada quantidade de exsudatos.	Algisite, Tegagen, Sorbsan, entre outros.	Barnett & Varley, 1987
Espumas	Materiais com capacidade de absorção limitada, relativamente isoladores e de fácil manuseamento minimizando as dores. Difícil absorção total da sua formulação por ser pouco compacta.	Recomendadas para feridas sem infeções e com poucos exsudatos.	3M Adhesive Foam, Tielle, Lyofoam, entre outros.	Han & Ceilley, 2017
Colagénio	Materiais com ação que auxilia o desenvolvimento de um ambiente propicio à cicatrização e que inibem ocorrência de fatores negativos (como proteases).	Recomendados para feridas recalcitrantes e crónicas	Hydrocoll, Collagene At, Cytoplast, entre outros.	Cullen *et al.*, 2002
Substitutos da pele	Materiais muito dispendiosos tanto pela forma de aplicação como pelo seu desenvolvimento. Obtidos através de uma mistura biológica (como fibroblastos) com outro tipo de material (como polímeros) que permitem a sua aplicação tópica. Comumente associados a riscos de infeção apesar da sua ação molecular.	Recomendado para lesões com elevada área superficial.	Alloderm, Apligraf, Biobrane, Laserskin, TransCyte, EZ Derm, entre outros.	Marston *et al.*, 2003; Hanft & Surprenant, 2002

Uma das principais vantagens do uso de materiais de colagénio e alginato, ambos de origem natural, é a facilidade de absorção de exsudatos sem deixar que a lesão cutânea resseque. Paralelamente, acabam por se tornar as alternativas menos dispendiosas quando comparadas com os substitutos de pele, por exemplo. Adicionalmente, já foi demonstrada a ação do colagénio, em terapias para lesões cutâneas, como um dos principais auxiliares à maturação de colagénio tipo I na última fase do processo de cicatrização cutâneo (Cullen *et al.*, 2002; Mathew-Steiner *et al.*, 2021). Relativamente ao alginato, também já se encontra reportada a sua ação no controlo de sangramento de feridas cutâneas, característica importante na fase de homeostasia (Barnett & Varley, 1987; Koga *et al.*, 2018).

Materiais semipermeáveis ou impermeáveis, como filmes semipermeáveis e hidrocolóides (Tabela 1), apresentam uma das maiores desvantagens a ser evitada aquando o tratamento de lesões cutâneas: a impossibilidade de oxigenação da ferida (Jones *et al.*, 2006). Apesar de se mostrarem mais resistentes quando comparados com espumas, por exemplo, a falta de oxigenação torna-se uma desvantagem capaz de gerar consequências incontornáveis (como a oclusão da lesão e, portanto, criação de um ambiente propício à infeção microbiana). Relativamente, por sua vez, às espumas, a sua aplicação apresenta uma formulação incapaz de se manter coesa na ferida, impedindo, muitas vezes que os seus compostos sejam absorvidos pela lesão levando, consequentemente, a uma ação diminuta (Han & Ceilley, 2017).

Os substitutos da pele são a categoria de terapias mais recente e de tecnologia superior por serem, frequentemente, impressos por impressoras 2D ou 3D e, por isso, altamente adaptáveis a qualquer tipo de lesão. Por este mesmo motivo, os seus constituintes, equipamentos e processos de otimização podem, ao longo do tempo, mostrar-se consideravelmente dispendiosos. De forma a minimizar este aspeto são, inúmeras vezes, usados materiais sintéticos cuja estabilidade é superior e cujo estudo e interação com outros compostos torna esta alternativa mais segura (Han & Ceilley, 2017; Khoeini *et al.*, 2021). Apesar das suas vantagens, estão de forma geral associados inúmeros efeitos secundários ao seu uso (*e.g.* toxicidade, desenvolvimento de resistência a antibióticos, entre outros), a sinergia entre compostos e acumulação dos mesmos ao longo do tempo no organismo vivo podem acabar por não se evidenciar vantajosas, sendo esta uma das consequências mais preocupantes dos materiais/compostos sintéticos (Hanft & Surprenant, 2002; Marston *et al.*, 2003; Schilrreff & Alexiev, 2022).

A necessidade de inovação e procura por alternativas naturais, biodegradáveis, biocompatíveis e capazes de se adaptar a todos os tipos de lesões (de diferentes tipos, tamanhos, profundidade e origens) é uma das maiores necessidades atuais (Pereira & Bártolo, 2016). Para tal, importa focar nas vantagens e propriedades

que podemos usar em soluções e/ou compostos naturais já existentes, previamente estudados e testados, e modificar/adaptá-los numa solução atual e progressiva consentânea com as necessidades.

3. Própolis: origem do produto natural

Desde tempos ancestrais a natureza é considerada uma fonte promissora dos mais variados compostos. A utilização destes em diversas áreas como alimentação, medicina, cosmética, agricultura, farmacêutica, aromoterapia, entre outros, é um conceito que se preserva desde sempre. Em particular, o interesse em produtos naturais para o tratamento de vários tipos de patologias tem sido alvo de bastante atenção devido, principalmente, a menores efeitos secundários, maior acessibilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e, em especial, por serem uma alternativa menos dispendiosa relativamente às soluções atualmente usadas na medicina (Balderas-Cordero *et al.,* 2023). Existem milhares de espécies vegetais e animais e seus respetivos derivados que apresentam bioatividades de elevado interesse terapêutico, podendo, no futuro, refletir potencial suficiente para posterior aplicação em novos tratamentos ou, de forma singular, fármacos de aplicação direta (Król *et al.,* 2013; Kasote *et al.,* 2022).

Própolis, um sub-produto da colmeia, nome de origem grega, é uma resina com consistência pegajosa comumente denominada "cola de abelhas". É uma mistura complexa, embora genericamente constituída por 50% de resina, 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de outras substâncias que incluem minerais e compostos orgânicos. Forma-se a partir de materiais vegetais coletados pelas abelhas de árvores, brotos, e outras fontes naturais. As abelhas misturam-nos com cera e secreções salivares, nomeadamente β-glucosidase, para criar uma substância que é usada para proteger e reforçar a colmeia (Silva Carvalho *et al.,* 2015; Yang *et al.*, 2022). O própolis é usado na colmeia como proteção contra agentes bióticos e abióticos, mais concretamente como isolamento térmico, contra o ataque de predadores e microrganismos, impedindo infeções microbianas, como agente antisséptico ou mesmo como material de reconstrução da própria colmeia em caso de deterioração (Kasote *et al.,* 2022; Silva Carvalho *et al.,* 2015).

O própolis é um material lipofílico, que apresenta alterações na sua flexibilidade conforme a temperatura a que se encontra, com aroma característico e coloração que varia de tonalidade desde verde a vermelho, assumindo frequentemente várias tonalidades de castanho. Na Figura 9 encontram-se representados três tipos de própolis distintos.



Figura 9: *Própolis (**A**) vermelho (Brasil), (**B**) europeu ou do tipo choupo e (**C**)verde (Brasil).*

Tanto a coloração deste produto natural como as suas características químicas e, consequentemente, as suas propriedades e bioatividades são influenciadas por diversos fatores macro e micro-geográficos, quer pela localização geográfica da colmeia, clima, estação, vegetação circundante, ou mesmo tipo de abelha (Bankova, 2005). A diversidade daqui resultante e a dificuldade de padronização têm dificultado a ampla utilização deste recurso natural na indústria (Kujumgiev *et al.*, 1999; Seidel *et al.*, 2008; Freitas *et al.,* 2019).

3.1. Bioatividades e aplicações do própolis

O própolis tem sido usado de forma extensiva desde os primeiros séculos numa variedade de aplicações, entre elas o tratamento de gripes, úlceras e feridas cutâneas pelas suas capacidades antimicrobiana analgésicas, e antissépticas (Sforcin, 2016). Na agricultura, o recurso a extratos de própolis como agente antifúngico (Falcão *et al.,* 2014; Jaski *et al.*, 2015), para a melhoria dos campos de cultura (Popova, 2023), melhoria do aspeto e tempo de prateleira dos alimentos (Tien *et al.*, 2021), promoção do crescimento (Carvalho & Sodré, 2021), entre outras, realçam o incentivo da utilização deste recurso natural. Existem, ainda, vários estudos desenvolvidos ao longo dos anos que relatam a eficácia do própolis como um produto natural antimicrobiano (Gharib & Taha, 2013), nomeadamente quando aplicado em lesões cutâneas (Abbaszadeh *et al.*, 2019; Babiker *et al.*, 2020; Malik *et al.*, 2021). Vários fatores, como a origem geográfica da amostra, dosagem e solvente da extração podem afetar a atividade antimicrobiana do própolis (Silva *et al.*, 2015; Franchin *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2022).

Em 1899 foi utilizado na regeneração de tecidos e feridas na Guerra dos Bóeres. Os egípcios utilizavam-no no embalsamento dos mortos, prevenindo a ocorrência de infeções. Os gregos e romanos utilizavam-no como agente cicatrizante e desinfetante bucal. O própolis era utilizado também pelos persas no tratamento de eczemas, mialgia e reumatismos. Este produto tem vindo a ser progressivamente usado em várias áreas pelas suas capacidades antimicrobiana, anti-inflamatória, anti tumoral, imuno moduladora, antioxidante, entre outras (Sforcin & Bankova 2011; Silva Carvalho *et al.,* 2015; Sforcin, 2016; Yuksel & Akyol 2016).

O estudo de várias amostras de própolis, das mais variadas localizações, tem vindo a confirmar inúmeros benefícios deste produto da colmeia. Por exemplo, o uso de pasta dentífrica com extrato de própolis do choupo, originário da Polónia (1,5%) combinado com óleos essenciais de outras fontes botânicas (*e.g.* óleo de *Melaleuca alternifólia* (0,5%), óleo de *Menthae piperitae* (0,2%), óleo de alecrim (0,2%), entre outros) , mostrou prevenir cáries ou gengivites em pacientes com fenda labial ou fenda palatina (Machorowska-Pieniążek *et al.*, 2021). Adicionalmente, foi destacada a ação do extrato de própolis da Polónia em creme dental durante 35 dias como fator preponderante para melhorar a condição peridontal em toda a cavidade oral e reduzir o sangramento gengival na área da fenda (Machorowska-Pieniążek *et al.,* 2021).

De forma geral, o recurso a extratos de própolis evidencia a eficácia das bioatividades deste produto. Por exemplo, a utilização de extrato de própolis do Brasil (Machorowska-Pieniążek et al., 2013) demonstrou a sua capacidade de eliminação das bactérias causadoras de cáries (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus acidophilus*) ou ainda a incorporação de extrato de própolis do Brasil em cremes dentífricos que, após aplicação em pacientes com implantes dentários, foi capaz de eliminar quatro espécies de microrganismos causadoras de infeções associadas ao procedimento (*Klebsiella oxytoca, Serratia liquefaciens, Staphylococcus epidermidis* MSCNS, *Sarcina* sp.) (Morawiec *et al.*, 2013). Estes resultados indicam a capacidade deste produto natural na manutenção da saúde oral, e prevenção de infeções microbianas, incentivando o seu uso (Morawiec *et al.*, 2013, 2013, 2021; Bapat *et al.*, 2021).

Num estudo a longo prazo *in vivo* sobre organismos com obesidade (Ichi *et al.*, 2009) e diabetes verificou-se que a utilização de extrato de própolis do Brasil permitiu mitigar complicações como nefropatia, necroses (impedindo a ação da bactéria causadora desta inflamação, *Streptomyces achromogenes*, (Kitamura, 2019)) retinopatia, úlceras nos pés, entre outras (Kitamura, 2019; Pahlavani *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2023). Ademais, existem ainda estudos que comparam a ação antimicrobiana do mel com a do própolis, neste caso ambos provenientes do Brasil, concluindo que o própolis (MIC de 0,44 a 2,01 mg ml $^{-1}$) tem uma ação superior contra bactérias como *Tetragonisca angustula* e *S. aureus* quando comparado com a ação do mel (MIC de 142,87 a 214,33 mg ml $^{-1}$) (Miorin *et al.*, 2003).

A atividade antimicrobiana, que representa especial interesse neste estudo, do própolis tem vindo a ser documentada contra inúmeras bactérias Gram-positivo e Gram-negativo em diversos estudos *in vitro* (Vieira *et al.*, 2024) e *in vivo* (El-Kersh *et al.*, 2024; Islam *et al.*, 2024; Melo *et al.*, 2024), assim como a sinergia entre os seus compostos, principalmente flavonóides, como a pinocembrina (Przybyłek & Karpiński, 2019; Almuhayawi, 2020). Recentemente, foi reportada a eficácia de um extrato etanólico de própolis proveniente do Brasil na concentração de 246,3 μg/mL contra microrganismos multi-resistentes como a bactéria Gram-

positivo *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (Veiga *et al.*, 2017). Outros estudos relataram uma eficácia considerável de extratos de própolis do Egito contra vários microrganismos como parasitas, bactérias, vírus e leveduras, observando-se por exemplo mais de 60% de inibição do crescimento do protozoário *Giardia duodenalis in vitro* quando exposto a concentrações de 250 e 500 mg/mL de extrato (Christov *et al.*, 1998; Saeed *et al.*, 2016). Num outro estudo sobre a atividade antifúngica do própolis do Brasil em que foram testadas 80 estirpes da levedura do género *Candida*, foi reportada atividade do própolis de acordo com a seguinte escala: *C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. guilliermondii*. Neste mesmo estudo foi estudada a possibilidade da eficácia de combinação de fármacos antifúngicos com própolis para o tratamento de infeções fúngicas por *C. albicans* tendo-se concluído que, em conjunto, a ação antifúngica dos compostos aumenta o efeito inibitório (Bankova *et al.*, 1995; Ota *et al.*, 2001).

Entre os inúmeros estudos focados na atividade antimicrobiana do própolis, importa também mencionar, pela relevância para o presente trabalho, estudos sobre a ação do própolis contra microrganismos comumente associados a infeções de lesões cutâneas. Neste contexto, Geyik *et al.*, (2024) relataram o efeito antimicrobiano em nanofibras poliméricas onde foi incorporado um extrato etanólico de própolis turco. Para cada material foram usados 100 μL de extrato a 0,15 g/mL, tendo-se destacado a capacidade antimicrobiana contra *C. albicans* , *S. aureus* e *Escherichia coli* – que exibiram halos de inibição com diaâmetro de, respetivamente, 15, 14 e 5 mm. No mesmo ano, Alarjani *et al.* (2024) desenvolveram um estudo que relata a capacidade antimicrobiana de extrato de própolis coreano incorporado num material de quitosano (Ch, do inglês *quitosan*) e álcool polivinílico (PVA, do inglês *polyvinyl alcohol*). As estirpes MRSA e *Clostridium perfringens,* comumente associadas a lesões cutâneas crónicas pela sua resistência a antibióticos, demonstraram suscetibilidade ao material formulado com 200 mg/mL de extrato. Os investigadores revelaram ainda, em ensaios *in vivo,* que a aplicação direta do extrato em feridas de ratos se traduziu numa redução significativa na infeção por MRSA. Os resultados demonstraram, ainda, a capacidade de cicatrização cutânea e restauro capilar no local (Alarjani *et al.*, 2024).

Num estudo *in vivo,* onde foi testada a capacidade antimicrobiana e de cicatrização do própolis do Brasil para o tratamento de feridas cutâneas crónicas, foi utilizada uma camada de pomada à base de extrato de própolis 5%, seguida de uma camada de gaze de algodão por toda a área onde o produto foi aplicado, por sua vez, no grupo de controlo foi aplicada uma camada de creme cicatrizante convencional com ácidos gordos enriquecidos com vitamina A e E, seguida também de uma camada de gaze de algodão. Após 30 dias, com limpeza diária do local comprometido (com 0,9% NaCl) seguida da reaplicação do tratamento,

foram obtidas diferenças significativas para o grupo controlo nas proporções do tipo de exsudato e conteúdo microbiano. Mais concretamente, nos pacientes onde foi aplicado o extrato de própolis, as lesões exibiam maiores proporções de tecido em cicatrização, mais exsudato seroso, bordas mais íntegras, ausência de feridas infetadas e menor intensidade de dor (Rocha *et al.*, 2024).

A bactéria Gram-negativo *Pseudomonas aeruginosa* é um dos patógenos mais oportunistas em humanos e animais, tendo já apresentado elevada resistência ao tratamento com antibióticos pela sua facilidade de formação de um biofilme, principalmente em lesões cutâneas, mas demonstrou suscetibilidade e uma redução populacional com a aplicação direta, na lesão, de um extrato hidroalcoólico de própolis do Azerbeijão 0,1 g/mL (Archin *et al.*, 2024). Apesar de não se saber exatamente qual o mecanismo da ação antimicrobiana do própolis, presume-se que o própolis aja causando danos estruturais nos microrganismos através da formação de uma barreira física que rodeia os patógenos, desta forma as enzimas e proteínas que iniciam o processo de ataque ao hospedeiro não conseguem progredir, inibindo-se o processo normal de multiplicação e infeção (Silva *et al.*, 2015; Bouchelaghem, 2022; Rosa *et al.*, 2022).

Na área agrícola, a contínua utilização de pesticidas é uma das situações mais preocupantes da atualidade, quer pelo seu reflexo diretamente na qualidade dos alimentos e campos agrícolas como pela presença, a longo prazo, destes compostos na cadeia alimentar (Gensch *et al.*, 2024; Mansfield *et al.*, 2024; Yahyah *et al.*, 2024). A utilização do extrato de própolis nos campos de cultivo resultou numa visível diminuição do desenvolvimento de organismos fitopatogénicos (Vilela, 2010; Jaski *et al.*, 2015), melhoria na preservação dos campos pós colheita (Carvalho & Sodré, 2021), melhoria na conservação de frutas e legumes (Segueni *et al.*, 2023), promoção do crescimento (Aly & Elewa, 2007), e desenvolvimento das culturas (Seibert *et al.*, 2019), entre outras (Carvalho & Sodré, 2021; Bankova & Popova, 2023). Pesquisas mais recentes indicam, ainda, um efeito antagónico *in vitro* de extratos etanólico de própolis distintos contra algumas bactérias fitopatogénicas Gram-positivo e Gram-negativo como *Agrobacterium tumefaciens, C. michiganensis, Erwinia chryssanthemi, Xantomonas axonopodis pv. phaseoli* (em culturas de feijão) (Baldin *et al.*, 2014) e *Xanthomonas gardneri* (Pereira *et al.*, 2002; Loureiro *et al.*, 2014; Jaski *et al.*, 2015). Apesar destes estudos comprovarem uma tendência positiva da ação de controle de extratos etanólico de própolis contra algumas doenças em plantas, em certas espécies vegetais é denotada uma insensibilidade a estes extratos, comumente associados à ação de bactérias do género *Pseudomonas* (Bianchini & Bedendo, 1998; Heimbach *et al.*, 2016).

Além da ação como bactericida, existem relatos que evidenciam a ação de extratos etanólicos de própolis do Brasil como fungicidas. Por exemplo, foram realizados testes laboratoriais e em campo em culturas de

café que comprovam o controle de doenças causadas por *Hemileia vastatrix* (ferrugem do café) (Pereira *et al.*, 2001) e *Cercospora coffeicolla* (cercosporiose) (Pereira *et al.*, 2008), diminuindo a incidência destas doenças até 65% e 75%, respetivamente, uma eficácia consideravelmente semelhante à obtida com fungicidas comerciais (Androcioli *et al.*, 2012). A aplicação dos extratos etanólicos de própolis nas folhas das espécies vegetais atua através da formação de uma camada que impede a penetração dos fungos, e que se deve ao conteúdo ceroso do própolis (Pereira *et al.*, 2008). Uma outra aplicação do própolis em espécies vegetais passa pela sua capacidade de conservação pós-colheita por meio de formação de um biofilme biodegradável, conforme já estudado em *Passiflora edulis flavicarpa* (maracujá amarelo) revestido de biofilme incorporado com extrato etanólico de própolis do Brasil, que revelou menor perda de massa e menor oxidação do fruto (Cunha *et al.*, 2017) ou em abacate (Daiuto *et al.*, 2012). O própolis egípcio revelou um efeito nematocida em raízes de *Solanum melongena* (beringela) contra *Tylenchulus semipenetrans* crescidas em condições de estufa (Bankova & Popova, 2023), com 71,8% de redução da população de nemátodes (Saadoon *et al.*, 2022). Um outro estudo de campo sobre a incidência do vírus do mosaico (*squash mocaic vírus* – SqMV) realizado em *Cucurbita* (abóboras oleaginosas) revelou uma redução de 70 a 80% das plantas sintomáticas após pulverização do extrato etanólico de própolis do tipo choupo em concentrações de 5 e 10% (Vučurović *et al.*, 2016). Ainda, o tratamento de *Solanum lycopersicum L.* (tomate), com 100 mg/mL de um extrato de própolis do Egito revelou um aumento significativo na área foliar da planta (2,5x superior), mas também do comprimento, altura, número de folhas e de flores (El-Hady *et al.*, 2021).

A atividade antioxidante do própolis tem vindo a ser testada e associada a este produto recorrentemente (Sheng *et al.*, 2007; Mello & Hubinger, 2012; Nichitoi *et al.*, 2021). A sua relevância é proveniente da capacidade dos compostos antioxidantes agirem prevenindo a formação de radicais livres ou convertendo-os em espécies inofensivas (Halliwell, 2024). A atividade antioxidante do própolis tem sido relacionada com a quantidade de compostos fenóis e flavonóides (Mello & Hubinger, 2012; Socha *et al.*, 2015), também a ação antifúngica tem sido correlacionada com a ação dos compostos fenólicos (Nichitoi *et al.*, 2021). A relevância da associação das bioatividades do própolis à sua composição química, por norma muito variável, e dependente de diversos fatores (micro e macro-geográficos como incêndios, desflorestação, perda de espécies vegetais o animais, entre outros ou alteração no solvente/método de extração) é um aspeto chave aquando da seleção da proveniência do extrato de própolis a usar. Destaque para um estudo desenvolvido por Miguel *et al.*, (2010) sobre a atividade antioxidante do própolis de várias zonas do Algarve realçando as amostras do Barrocal por apresentaram melhores capacidades de eliminação de radicais livres (IC_{50} mg/mL) 0,009 ± 0,001 no inverno e 0,025 ± 0,005 no verão) do que as das demais áreas (*e.g.* Serra

do Algarve com 0,027 ± 0,002 no inverno e 0,029 ± 0,003 no verão), independente do método para avaliação da atividade antioxidante e da época de colheita. Tais os resultados correlacionaram-se estreitamente com os níveis de fenóis, polifenóis e flavonóides totais nas amostras.

Apesar das suas imensas bioatividades, o própolis é um produto natural que exibe grande diversidade química. Ainda, a possibilidade de surgirem novos compostos em diferentes anos de colheita, com bioatividades distintas, pode alterar a sinergia dos compostos já existentes, modificando consequentemente a ação do produto como um todo (Freitas *et al.,* 2019). Esta variabilidade constitui um entrave ao desenvolvimento de produtos à base de própolis e impedem a sua aceitação e introdução na indústria. Inúmeros estudos (Falcão *et al.,* 2013; Freitas *et al.,* 2019; Wieczorek *et al.,* 2022; Peixoto *et al.,* 2022) têm procurado contornar estas limitações, no sentido de viabilizar o aproveitamento deste recurso natural e das suas múltiplas bioatividades(Kasote *et al.,* 2022; Silva Carvalho *et al.,* 2015). Assim, a seleção do tipo de própolis com base na sua origem/região onde as colmeias se encontram pode ser uma ferramenta essencial para a futura utilização deste produto natural na indústria (Wieczorek *et al.,* 2022; Caetano *et al.*, 2023).

3.2. Composição química do própolis mediante a localização geográfica da sua colmeia: Portugal, Europa e Mundo

De uma forma geral, os principais compostos químicos do própolis incluem ácidos fenólicos, flavonóides, fenóis, terpenos, aldeídos, álcoois aromáticos, ácidos gordos, estilbenos, aminoácidos, vitaminas, minerais e β-esteróides (Silva Carvalho *et al.,* 2015; Sforcin 2016; Kasote *et al.,* 2022). Existem, no entanto, inúmeras variações na constituição destes compostos. Atualmente, mais de 800 compostos já foram identificados em amostras de própolis, com destaque para os compostos flavonóides e fenólicos que detêm as capacidades biológicas ativas mais associadas a este produto natural (Araújo *et al.,* 2022).

Diferenças na composição química do própolis, intimamente dependentes das fontes botânicas que lhe dão origem, têm sido usadas para categorizar diferentes tipos de própolis (Tabela 2). Originário da Europa, América do Norte, grande parte do continente asiático e Norte de África é o própolis do tipo choupo, a partir essencialmente das espécies vegetais *Pinus sylvestris* (pinheiro silvestre) e *Populus nigra* (choupo-negro ou álamo), rico em ácido cafeico e flavonóides (Bankova *et al.*, 2018). Por sua vez, o própolis verde é proveniente do Brasil, produzido a partir essencialmente da espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim do campo), reconhecido pela sua concentração em artepilina-c (Tsuda & Kumazawa, 2021). Também originário do Brasil, Cuba e Venezuela distingue-se o própolis vermelho cujos constituintes encontrados em maior quantidade são os isoflavonóides, produzido essencialmente pela espécie vegetal

Dalbergia ecastaphyllum (Rabo-de-bugio ou Canelinha) (Mendonca-Melo *et al.*, 2017). Por fim, destaca-se o própolis proveniente da Austrália, um tipo distinto de própolis do tipo choupo, caracterizado pela variedade de espécies vegetais que estão na sua origem, destacando-se essencialmente *Acacia paradoxa*, dando origem a um tipo de própolis caracterizado pela presença de diversos compostos flavonóides como a pinostrobina (Tran *et al.*, 2022).

Tabela 2: *Comparação de diferentes tipos de própolis, a sua origem geográfica, fonte botânica e composição química.*

Tipo de própolis	Origem geográfica	Fonte botânica	Composição química (principais compostos)	Referências
Português (própolis do tipo choupo)	Bragança, Miranda do Douro, Chaves, Montalegre, Gerês, Boticas, Barcelos, Guarda, Fundão, Nisa, Figueira da Foz, Leiria, Coruche, Aljezur, Moncarapacho, Açores (S. Miguel e Terceira) e Madeira.	*Populus spp.,* predominantemente *P. nigra*	Ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido cinâmico e seus ésteres, pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina, quercetina, acacetina, entre outros	(Falcão *et al.*, 2013; Silva, 2023; Silva-Carvalho *et al.*, 2015)
Europeu e Mediterrâneo (própolis do choupo)	Áustria, Alemanha, França, Bulgária, Itália, Suíça, Argélia, Grécia, Malta, Turquia. Rússia	*P. nigra, P. tremula*, *Populus spp.*, *Conifer spp.*, *Cistus spp.*, *Ferula spp.,* provavelmente *Ferula communis*, *Populus spp.*, *Eucalyptus spp.* e *Castanea sativa*. *Betula spp.* (*B. verrucosa, B. pendula e B. pubescens*)	Ácido cafeico, ácido málico, ácido benzoico, ácido ferrúlico e seus ésteres, pinocembrina, galangina, pinobanksina e o seu acetato, crisina, flavonóides, ácidos diterpénicos, ferruginol, totarol, isoagatol, naringenina, tectotrisina, apigenina, pilosina, ladeneina, ésteres de ácidos aromáticos, flavonóis e fenóis, entre outros. Ácidos cinâmicos, sesquiterpenóides, fenilpropanóides, acacetina, apigenina, ermanina, ramnocitrina, campferide, α-acetoxibetulenol, entre outros.	(Bankova *et al.*, 2002; Hegazi *et al.*, 2000; Silva, 2023; Silva-Carvalho *et al.*, 2015; Popova *et al.*, 2007; Kasote *et al.*, 2022) (Fabris *et al.*, 2013)
Africano (própolis do choupo)	Camarões, Congo, Nigéria, Quénia, Etiópia, Omã, Tailândia	*Musa schweinfurthii*, *Acacia spp.*, *Azadirachta indica*, *Magnifera indica* e *Styrax spp*.	Isoflavonóides, isoflavonóides prenilados e estilbenóides, triterpenos, lignanas, geranilestilbenos e geraniflavona, triterpenóides, triterpenos, chalconas, cardanol, cardol, ácidos anarcádicos, (E)cinamil, (E)cinamilidenato, entre outros.	(Silva, 2023; Silva-Carvalho *et al.*, 2015)

Tabela 2 (continuação): *Comparação de diferentes tipos de própolis, a sua origem geográfica, fonte botânica e composição química.*

Americano (própolis vermelho)	Brasil, Cuba, Venezuela	*Baccharis* spp. (*B. dracunculifolia*), *Clusia* spp. (*C. rosea* e *C. minor*)	Biochanina A, fenilpropanóides prenilados, ácidos fenólicos, ácido p-coumárico, acetofenonas, ácidos diterpénicos, ácidos diterpénicos, ácidos cafeoilquínicos, campferide, isosakuranetina, campferol, formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, benzofenonas entre outros	(Fabris *et al.*, 2013; Silva, 2023; Silva-Carvalho *et al.*, 2015)
Americano (própolis verde)	Brasil	*Dalbergia ecastaphyllum*, *Clusia* spp. (*C. rosea* e *C. minor*)	Artepilina-c, fenilpropanóides prenilados, ácidos fenólicos, ácido p-coumárico, acetofenonas, ácidos diterpénicos, ácidos diterpénicos, ácidos cafeoilquínicos, campferide, isosakuranetina, campferol, formononetina, isoliquiritigenina, liquiritigenina, medicarpina, biochanina A, benzofenonas entre outros.	(Fabris *et al.*, 2013; Silva, 2023; Silva-Carvalho *et al.*, 2015)
Australiano (própolis do choupo)	Austrália	*Acacia paradoxa*	Xanterrol, oterostilbeno, sacuranetina, pinostrobina, estilbenos, tetrahidroxiestilbenos, prenilados, ácidos cinâmicos, flavononas, flavonóis, chalconas, entre outros.	(Silva, 2023; Silva-Carvalho *et al.*, 2015)
Asiático e Pacifico (própolis do choupo)	Tailândia, Indonésia, Birmânia, Havai, Taiwan, Okinawa	*Macaranga tanarius*, *Mangifera indica* e *Styrax* sp.	Flavonóides prenilados, alc(en)resorcinóis, triterpenos, flavonas preniladas, fenilaliflavona, (E)cinamil, (E)cinamilidenato, entre outros.	(Silva, 2023; Silva-Carvalho *et al.*, 2015)

O aproveitamento das bioatividades do própolis para aplicações na indústria representa uma abordagem progressista. Dada a diversidade deste produto natural, a sua caracterização química é fundamental para possibilitar a utilização do tipo de própolis mais apropriado para cada aplicação, visando diferenciar o potencial de aplicação terapêutica mediante a localização de produção do própolis. Por exemplo, Jiang *et al.* (2020) realizaram um estudo que visa a utilização de própolis de origem chinesa para a indução de apoptose em células cancerígenas. A análise química dos extratos usados reflete quantidades de alguns compostos fenólicos e flavonóides em menor concentração do que nas várias amostras de própolis português (Freitas *et al.,* 2022; Araújo *et al.,* 2022; Peixoto *et al.,* 2022; Caetano *et al.,* 2023). O mesmo foi observado por Teerasripreecha *et al.* (2012), em extratos de própolis provenientes da Tailândia, onde encontraram dois compostos químicos bioativos em maior abundância - cardanol e cardol -, reconhecidos pelas suas capacidades citotóxicas/anti proliferativas.

Após análise das principais características dos tipos de própolis mencionados é importante focar no própolis português, que será o tipo de própolis usado no presente trabalho.

3.3. Própolis português: o própolis do Gerês

O própolis português é um própolis do tipo choupo e tem sido caracterizado pela presença de compostos fenóis, flavonóides e polifenóis. De entre os vários compostos químicos já analisados nas amostras de própolis português distinguem-se o ácido cafeíco, ferrúlico, cinâmico e fórmico, o kaempferol, a quercetina, pinocembrina e pinobanksina, caracterizados pelo seu odor floral e pela sua vasta utilização na indústria cosmética, farmacêutica e alimentar (Falcão *et al.*, 2013; Silva-Carvalho *et al.*, 2015). Ademais, análises de amostras de própolis proveniente das ilhas da Madeira e Açores revelaram compostos até então não identificados em própolis do continente, como ácido elágico, luteolina, kaempferida e, ainda, uma concentração de compostos fenólicos inferior à encontrada nas amostras analisadas com origem portuguesa (Falcão *et al.*, 2013).

O presente estudo tem por base a utilização de própolis português proveniente do Gerês, cuja análise química e biológica tem sido alvo de estudos recorrentes ao longo das últimas décadas pelo nosso grupo de investigação. Esses estudos têm revelado múltiplas bioatividades, nomeadamente as atividades antimicrobianas (Freitas *et al.*, 2019; Oliveira, *et al.*, 2022), antioxidante (Freitas *et al.*, 2019; Peixoto *et al.*, 2021), anti inflamatória (Araújo *et al.,* 2022), anticancerígena (Freitas *et al.*, 2022; Caetano *et al.*, 2023) e manutenção da sua composição química e biológica ao longo dos anos (Freitas *et al.*, 2019; Peixoto *et al.,* 2022; Pereira *et al.*, 2023).

Um estudo sobre as bioatividades do própolis do Gerês após alteração geográfica das colmeias produtoras indica capacidade antioxidante deste própolis superior a outras amostras analisadas anteriormente provenientes do Fundão (Moreira *et al.*, 2008) e Algarve (Miguel *et al.*, 2010), teores de polifenóis e flavonóides totais semelhantes aos das análises de anos anteriores (Freitas *et al.*, 2024) e, ainda, atividade antimicrobiana similar também à observada em anos anteriores (Oliveira *et al.*, 2017; Freitas *et al.*, 2019). Em relação à atividade antimicrobiana do própolis do Gerês destaca-se a sua ação superior contra bactérias Gram-positivo como *Bacillus subtillis*, *S. aureus* ou ainda, particularmente interessante para este trabalho MRSA e *Staphylococcus epidermidis*, quando comparada com a ação de própolis originário de outras localidades como Alemanha (Al-Ani *et al.*, 2018) e Turquia (Przybyłek & Karpiński, 2019), respetivamente.

Com relação à capacidade de manutenção da composição química de extratos de própolis do Gerês ao longo dos anos e das suas bioatividades, Peixoto e colaboradores (2022) realizaram um estudo focado em extratos de própolis do Gerês, a partir de amostras recolhidas em 5 anos consecutivos, de forma a procurar soluções para contornar a problemática da variabilidade composicional deste produto natural. Os resultados desse estudo reenfatizam não só o potencial do própolis do Gerês e das suas bioatividades, mas mostram também que misturar diferentes amostras, independentemente da data de colheita, pode contribuir para a padronização do própolis, ao mesmo tempo que aumenta a sua disponibilidade e lhe agrega valor (Peixoto *et al.*, 2022).

A sinergia entre extratos de anos distintos de própolis do Gerês ao longo dos anos comprova o imenso potencial do própolis desta origem geográfica, tendo já sido adicionalmente comprovada esta mesma sinergia entre extratos de própolis do Gerês e mel (também do Gerês) como auxiliar na redução do crescimento das leveduras *C. albicans* e *S. cerevisae*, estirpes cuja ação do própolis do Gerês apresenta menos sensibilidade (Feás & Estevinho, 2011; Gomes *et al.*, 2011), melhorando a eficácia das suas bioatividades.

Assim, a utilização de extratos de própolis de origem portuguesa, mais particularmente do Gerês, pode revelar-se vantajosa no presente trabalho, pelos elevados teores em compostos fenólicos e flavonóides e a sua associação a várias bioatividades particularmente vantajosas para o tratamento de lesões cutâneas (Araújo *et al.,* 2022; Caetano *et al.,* 2023).

3.4. A aplicação e versatilidade do própolis para o tratamento de feridas cutâneas

A aplicação do própolis, de forma direta ou indireta, com o intuito de impedir a infeção microbiana e, consequentemente, acelerar a cicatrização/tratamento de feridas cutâneas tem especial interesse neste trabalho. Alguns estudos comprovam a sua utilidade na recuperação de queimaduras e melhoria da proliferação celular cutânea (Ibrahim *et al.*, 2022; Salrian *et al.,* 2022; Balderas-Cordero *et al.*, 2023; Kapare *et al.,* 2023). A sua capacidade biológica no âmbito do tratamento de feridas pode estar interligada com todas as outras capacidades terapêuticas mencionadas anteriormente tais como a sua capacidade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante são capazes de prevenir a infeção e inflamação na lesão (Barud *et al.*, 2013; Marquele-Oliveira *et al.*, 2019; Balderas-Cordero *et al.*, 2023). Adicionalmente têm vindo, ainda, a ser desenvolvidos materiais incorporados com compostos com bioatividades antimicrobianas, antioxidantes, imunomoduladoras, regenerativas, entre outras tal como o própolis, auxiliando a que cada fase deste processo de cicatrização decorra com sucesso (Sforcin 2016; Abbaszadeh *et al.*, 2019; Phonrachom *et al.*, 2023; Brito-Pereira *et al.*, 2024).

Vários tipos de própolis, como o indiano (Iyyam Pillai *et al.*, 2010), polaco (Rojczyk *et al.*, 2020), português (Afonso *et al.*, 2020), entre outros, demonstraram ser capazes de acelerar o processo de renovação cutânea após lesão ao impedir a infeção microbiana no local (Barud *et al.*, 2013), reduzir a formação de cicatriz (Ibrahim *et al.*, 2022), diminuir o tamanho do tecido danificado (Malik *et al.*, 2021), melhorar a reepitelização no local comprometido (Jacob *et al.,* 2015), bem como acelerar a reparação do tecido de forma geral (Balderas-Cordero *et al.*, 2023). O própolis do Brasil revelou capacidade de modulação da distribuição de vários fatores (principalmente colagénio I, III, metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9, do inglês *matrix metalloproteinase-9*) , VEGF, aminas vasodilatadoras, fatores de agregação plaquetária, entre outros), bem como elevada atividade fibroblástica (Barroso *et al.*, 2012; Oryan *et al.*, 2018). A substituição de colagénio tipo III por colagénio tipo I é fulcral para a reconstrução da camada epidérmica da pele, para a sua elasticidade, estrutura e força e esta só é possível através da atividade fibroblástica, daí a sua importância (Oryan *et al.*, 2018). A ação anti-inflamatória do própolis foi também constatada em vários materiais, como filmes poliméricos com extrato de própolis incorporado, tendo o perfil inflamatório das lesões passado de crónico para agudo em 7 dias (Oryan *et al.*, 2018; Balderas-Cordero *et al.*, 2023). Os resultados obtidos que demostram a forma de ação deste composto tornam a sua aplicação para o tratamento de feridas cutâneas uma abordagem interessante e promissora.

Os mecanismos moleculares do efeito protetor mediado pelo própolis em lesões cutâneas e os seus principais locais de ação encontram-se representados na Figura 10 .

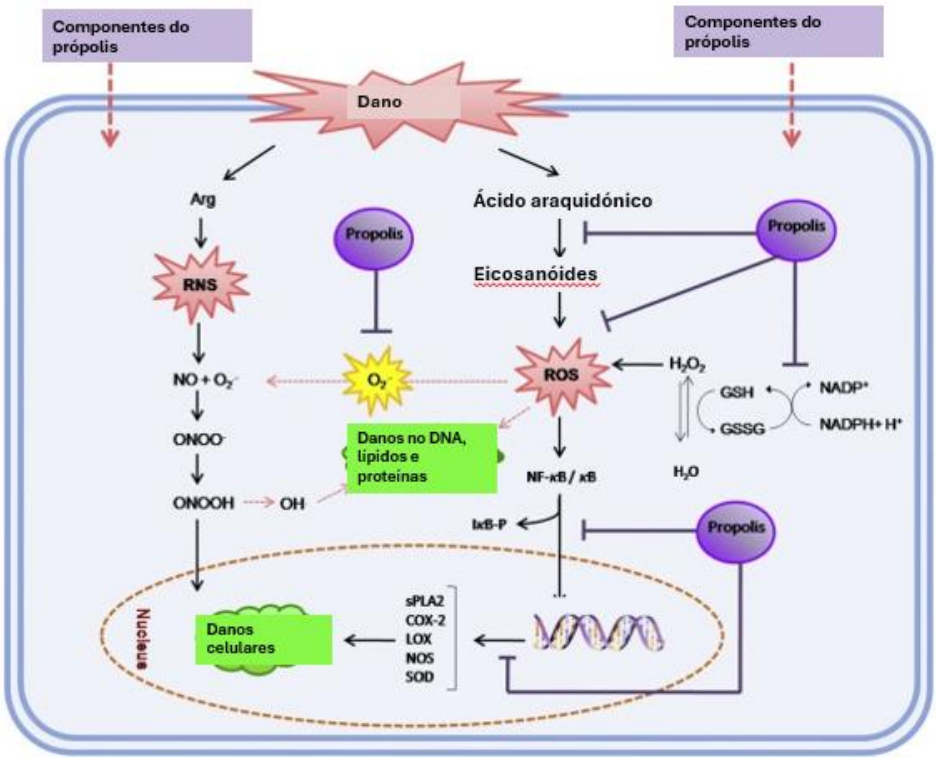


Figura 10: *Mecanismo molecular do efeito protetor mediado por própolis durante o stresse oxidativo em lesões cutâneas. Adaptado de Oryan et al., (2018)*

Uma das consequências imediatas da disrupção da pele é a interação de moléculas da membrana celular destruída que ativam NADH oxidases. Estas, por sua vez, produzem espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e de nitrogénio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) cuja ação é capaz de danificar proteínas, lípidos e DNA celulares (Farooqui & Farooqui, 2010). Estes compostos podem ainda estimular a translocação de fatores pró-inflamatórios (*e.g.* COX-2 (ciclo-oxigenase 2) e LOX (lisil-oxigenase)) para o núcleo das células da pele causando eventualmente um atraso no processo de cicatrização, incapaz de ultrapassar a fase inflamatória. Uma das consequências mais comuns deste processo é a invasão microbiana no local e consequente infeção (Parihar *et al.*, 2008; Farooqui & Farooqui, 2010). O uso de própolis já demonstrou ser capaz de travar a infeção microbiana agindo diretamente na inibição de NADH oxidases, ROS, RNS e, ainda, nos seus fatores pró-inflamatórios de forma a modular a resposta inflamatória da pele à lesão, auxiliando o processo de cicatrização e inibindo o ataque microbiano (Figura 10) (Oryan *et al.*, 2018; da Rosa *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022).

A aplicação de materiais com extrato de própolis para o tratamento de feridas cutâneas tem vindo a ser alvo de bastante atenção e estudo desde os anos 2000, sendo o principal objetivo o desenvolvimento de um material com as características ideais para aplicação tópica e que simultaneamente seja compatível

com o própolis, permitindo que a ação de ambos seja complementar e sinérgica, não competitiva ou inibitória.

Pelas bioatividades já enunciadas, a aplicação deste produto natural sob a forma de extrato em formulação com cremes cicatrizantes, incorporando-o em têxteis, nano fibras (Tien *et al.*, 2021), hidrogéis (Kapare *et al.*, 2023), filmes poliméricos (Madian *et al.*, 2023), nano partículas, entre outros, são abordagens com base na manufatura aditiva (ou impressão 3D) estudadas e desenvolvidas para o tratamento desta patologia (da Rosa *et al.*, 2022; El-Sakhawy *et al.*, 2023). O maior desafio nesta tarefa é o equilíbrio requerido na ação deste material de forma a que seja suficientemente permeável à oxigenação da lesão e, simultaneamente, impermeável à invasão microbiana, mas ainda está longe o alcance da solução "ideal" (Oryan *et al.*, 2018; Beteg *et al.*, 2019; Khodabakhshi *et al.*, 2019; Stojko *et al.*, 2021) capaz de colmatar as desvantagens dos materiais já desenvolvidos e tirar partido das suas vantagens.

4. Manufatura aditiva (Impressão 3D) e contexto histórico

A manufatura aditiva, recorrentemente denominada por impressão 3D, é descrita como sendo um processo de junção de materiais com o propósito de produção de um objeto, geralmente camada a camada, através da digitalização do seu modelo tridimensional (Standard, s.d.). Os primeiros trabalhos e patentes de impressão 3D datam de 1977, quando Swainson e Kremer desenvolveram um sistema 3D com base na polimerização direta ou indireta de estruturas sólidas e precisas (Xie *et al.*, 2022). A primeira peça produzida por impressão 3D remonta a 1983 e a sua impressão foi feita por estereolitografia (SLA, do inglês *stereolithography*), imprimindo sequencialmente camadas sobrepostas de um material curável por radiação ultravioleta (Figura 11) ("Our Story | 3D Systems," 2009; Norman, 2021).



***Figura 112**: Primeira peça produzida por SLA em 1983. Retirado de Wong & Hernandez (2012)*

Na última década assistiu-se a uma rápida evolução nesta área da impressão 3D (Chua *et al.*, 2010; Agarwala, 2016; Agarwala & Yeong, 2016; Prete *et al.,* 2023; Uchida & Bruschi, 2023). O interesse

acrescido deve-se essencialmente à simplicidade operacional, velocidade de processamento, baixo custo e possibilidade de customização dos materiais a produzir (Agarwala, 2016). A impressão 3D funciona através de modelos de designs ou sistemas de controle numéricos computorizados, onde são digitalizados os modelos dos produtos reais antes de serem manufaturados. A digitalização prévia permite a sua modificação de forma simples e imediata, possibilitando uma prototipagem rápida, tanto num contexto industrial como em investigação, para as mais diversas aplicações, como manufatura, arquitetura, energia, assistência média, entre outros (Agarwala, 2016; Fang *et al.*, 2022).

Reconhecer os diferentes tipos de impressão 3D é uma das metodologias mais fáceis para que o produto desenvolvido tenha por base a tecnologia de manufatura aditiva que mais se encaixa nas suas necessidades e customizações.

4.1. Tecnologias de impressão 3D

Existem vários artigos que distinguem as diferentes tecnologias de impressão 3D/manufatura aditiva existentes (Figura 12) (Jasveer & Jianbin, 2018; Shahrubudin *et al.*, 2019; Ntousia & Fudos, 2019; Jadhav & Jadhav, 2022), e dentro das quais se inserem várias técnicas especificas para cada matéria-prima e material que se pretenda imprimir.



Figura 12: *Classificação dos tipos de manufatura aditiva. Adaptado de Jadhav & Jadhav, (2022)*

Uma das tecnologias de impressão 3D mais antigas é a fotopolimerização Vat (VPP, do inglês *vat polymerization*), uma técnica recorre a um fotopolímero que é curado por aplicação de uma fonte de luz/energia passando ao estado sólido por ação de luz ultravioleta ou regiões da luz visível. Dentro desta categoria distingue-se principalmente o SLA (esteriolitografia, do inglês *stereolithography*) uma das técnicas de impressão 3D mais utilizadas, e a mais antiga (Gardan, 2017; Gibson *et al.*, 2021). A fusão de leito em pó (PBF, do inglês *Powder Bed Fusion*) é uma técnica usada no fabrico de peças de elevada performance com resistência mecânica superior, tendo por base o recurso a matérias-primas em pó, fundindo-as camada a camada. Algumas das técnicas mais usadas que se inserem neste grupo são fusão seletiva a laser (SLM, do inglês *Selective Laser Melting*), sinterização seletiva a laser (SLS, do inglês *Selective Laser Sintering*) e fabricação aditiva por feixe de eletrões (EBM, do inglês *Electron Beam Melting*) (Singh *et al.*, 2020; Rosen, *et al.*, 2021).

A tecnologia MEX (do inglês, *material extrusion*) ou de extrusão de material consiste em forçar a saída do material que geralmente usa a ação do calor para se fundir, através de um bico de extrusão de forma controlada. O material é posteriormente depositado num substrato, preenchendo uma forma pré-definida do objeto 3D, camada a camada (Rosen, *et al.*, 2021). Esta é a tecnologia utilizada no presente trabalho e é, atual e simultaneamente, a mais utilizada em todo o mundo, acessível também ao consumidor comum (Guo & Leu, 2013; Rosen, *et al.*, 2021). Nesta classe de manufatura aditiva qualquer material no estado líquido capaz de solidificar rapidamente pode ser processado, quer esta reação seja por aplicação de calor (como no caso da técnica fabrico de filamento fundido, FDM, do inglês *Fused Deposition Modeling*), por ação de algum agente de cura ou por evaporação do solvente. Desta forma, a bio extrusão de componentes biocompatíveis e biodegradáveis torna-se possível, como por exemplo, na impressão 3D de *scaffolds* e membranas/filmes à base de biopolímeros, como quitosano e colagénio, biomateriais processáveis (Ajdary *et al.*, 2021; He *et al.*, 2023). A técnica de impressão de hidrogéis e biotintas é denominada escrita direta com tinta (DIW, do inglês *Direct Ink Writing*), tendo várias variantes dependendo do estado físico do material a ser impresso, do próprio material ou da sua posterior aplicação (Rosen, *et al.*, 2021).

4.1.1. Impressão por jato de tinta

A impressão 3D por jato de tinta (Figura 13) é uma técnica de impressão sem contacto que posiciona gotas extremamente pequenas de uma determinada bio tinta num substrato desejado (Abeyewickreme *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013; Khoeini *et al.*, 2021).

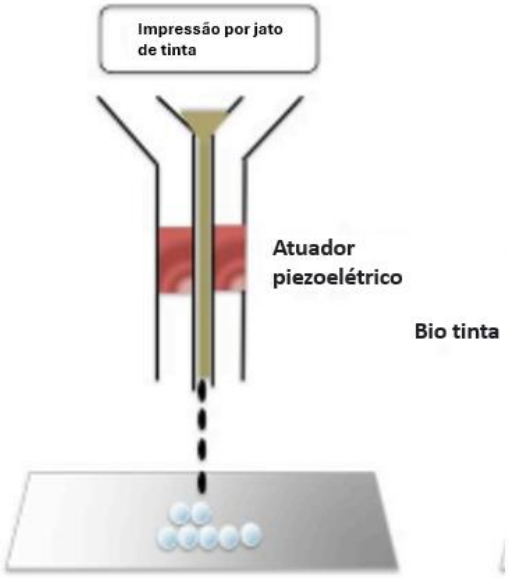


***Figura 13**: Esquema representativo da impressão por jato de tinta. Adaptado de Agarwala, (2016)*

Esta tecnologia pode, ainda, ser diferenciada em dois tipos distintos: jato contínuo ou extrusão sob demanda (DOD, do inglês *drop on demand*). A impressão com jato contínuo funciona com recurso a um reservatório que produz as gotas de tinta através de um bico com elevada estabilidade, criando um fluxo contínuo e constante (Xu *et al.*, 2013). No caso da impressão com DOD, tal como o nome sugere, as gotas são extrudidas em intervalos regulares, conforme, e quando, solicitado. As gotas de bio tinta são sujeitas a um campo eletrostático que as desvia para que sejam impressas no substrato ou permaneçam não desviadas para serem reutilizadas, esta manipulação é dependente da estrutura que se pretende imprimir (Binder *et al.*, 2011). Este tipo de impressão pode ser classificado como de jato de tinta térmico ou piezoelétrico (Agarwala, 2016).

4.1.2. Impressão por extrusão

Este tipo de impressão 3D, a usada no presente trabalho, funciona através da deposição contínua de um filamento de matéria-prima ou bio tinta, que é forçado através de um bico, de forma controlada, originando uma estrutura 3D (Figura 14).

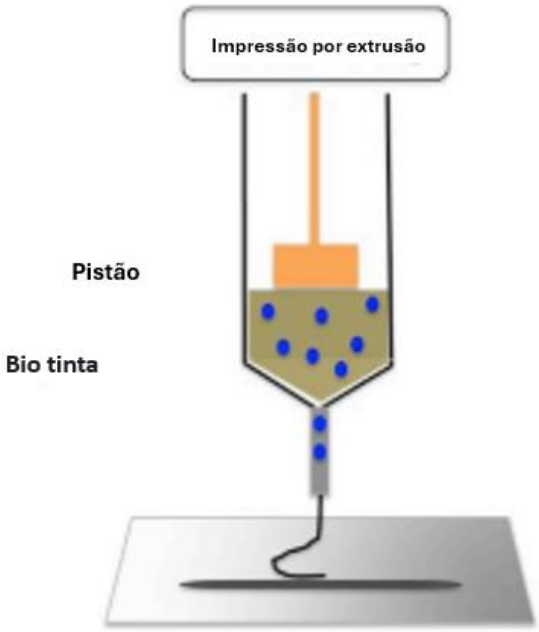


***Figura 14**: Esquema representativo da impressão por extrusão. Adaptado de Agarwala, (2016)*

Funciona com recurso a uma seringa acoplada à impressora, que é motorizada e cujo trajeto pode ser controlado nos 3 eixos de movimento de forma a alcançar o material desejado (Fang *et al.*, 2012; Khoeini *et al.*, 2021; Fang *et al.*, 2022). Para a impressão por extrusão de células ou compostos termicamente sensíveis, o material impresso deve ter um nível de viscosidade relativamente elevado, mas que consiga ser impresso pela seringa sem necessidade de aplicação de temperatura. Por este mesmo motivo, este é o tipo de impressão mais apropriado para o desenvolvimento de materiais com uma ou mais camadas em que a manutenção das propriedades dos compostos seja um dos principais objetivos, como no caso da impressão de materiais com produtos naturais (Fedorovich *et al.*, 2007).

4.1.3. Impressão por microválvulas

A deposição de células por sistemas de microválvulas, representada na Figura 15, foi explorada inicialmente em 2007. Nesse ano foram desenvolvidas impressoras com 4 dispensadores que se localizavam por cima de um suporte com os 3 eixos de movimento para a impressão 3D, podendo, desta forma, imprimir simultânea ou sequencialmente vários materiais.

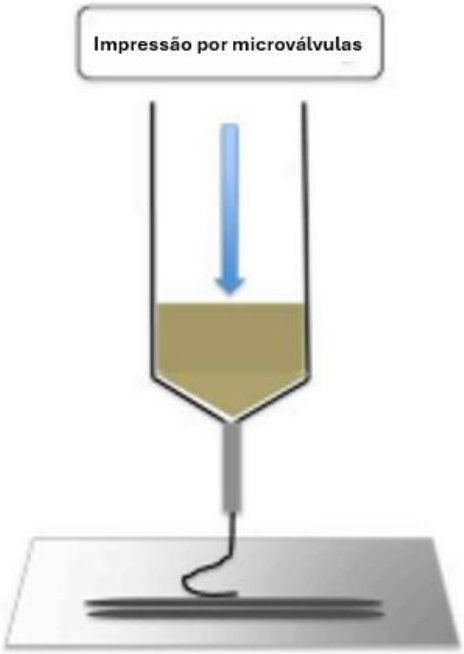


***Figura 15**: Esquema representativo da impressão por microválvulas. Adaptado de Agarwala, (2016)*

As válvulas podem funcionar através de força mecânica, elétrica ou magnética para abrir e fechar, iniciando ou terminando a impressão. Para controlar a viscosidade da bio tinta são usados sistemas de controle de pressão distintos. Este tipo de impressão utiliza constantemente pressão pneumática controlada para estruir pequenas gotas através das válvulas e depois pelo bico, sendo considerada uma técnica de alta velocidade de impressão capaz de funcionar com elevada densidade celular (Demirci & Montesano, 2007; Agarwala, 2016; Gungor-Ozkerim *et al.*, 2018; Khoeini *et al.*, 2021).

4.1.4. Bio impressão por laser

Na bio impressão por laser 3D, também denominada impressão de orifício livre, a impressão funciona pela ação de um laser e é responsável por guiar todo o processo de impressão. Este sistema de impressão (Figura 16) requer a fonte do feixe de laser, um sistema de foco e um suporte para impressão.

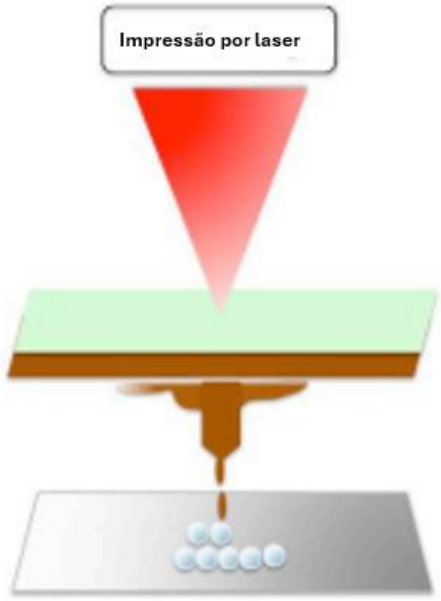


***Figura 16**: Esquema representativo da impressão por laser. Retirado de Agarwala, (2016)*

O funcionamento desta tecnologia inicia-se focando o feixe de laser de forma a criar uma "armadilha" de luz que força as células a serem guiadas e, portanto, impressas no substrato conforme a estrutura desejada (Odde & Renn, 2000; Schiele *et al.*, 2010; Schiele *et al.*, 2011; Malda *et al.*, 2013; Khoeini *et al.*, 2021; Guo, *et al.*, 2022).

Para além da seleção da técnica de impressão 3D mais indicada para o desenvolvimento do produto final e da sua consequente aplicação deve ter-se em conta o tipo de matéria-prima usada para a manufatura. A possibilidade de utilização de polímeros de origem sintética e natural para impressão 3D surge como uma das maiores vantagens desta abordagem já que possibilita a customização total do produto desenvolvido e, consequentemente, as suas capacidades/características, permitindo que sejam incorporados compostos/produtos de origem natural para melhor aproveitamento das suas bioatividades (He *et al.*, 2023). Reconhecer a variedade de bio tintas sintéticas e naturais para impressão 3D, as suas vantagens e desvantagens bem como quais os estudos e protótipos já desenvolvidos é o primeiro passo para selecionar a(s) matéria(s)-prima(s) para o desenvolvimento do produto.

4.2. Bio tintas de base polimérica sintética e natural

A bio tinta ideal deve possuir as propriedades físico-químicas, características mecânicas, reológicas, químicas e biológicas desejadas, mantendo a mecânica de correspondência de tecido, preferencialmente de forma ajustável. O processo de cristalização/gelificação/solidificação deve adaptar-se à impressão; o material deve, ainda, ser biodegradável, mimetizando o microambiente natural dos tecidos (especialmente relevante no contexto do presente trabalho) e o potencial para produção em larga escala deve apresentar variações mínimas de lote para lote. Atualmente, as bio tintas em forma de hidrogel/filme são o material mais usado para a impressão 3D, dada a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e a existência de locais de ligação para fixação, crescimento e diferenciação celular (Bregg, 2005; Gungor-Ozkerim *et al.*, 2018; Roseti *et al.*, 2018; Khoeini *et al.*, 2021).

Vários tipos de bio tintas foram já usadas: à base de polímeros naturais (como quitosano (Costa *et al.*, 2017), alginato, gelatina (Moreira *et al.,* 2019), colagénio, fibrina, goma gelana, seda, ácido hialurónico, dextrano, quitina (Murakami *et al.*, 2010), entre outros) (Khoeini *et al.*, 2021), à base de polímeros sintéticos (Prete *et al.*, 2023)(como polímeros de cristal líquido, LPCs, do inglês *liquid polymer cristals*) polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), acetato de polivinila (PLA) (Bagheri *et al.*, 2020), entre outros), à base de agregados celulares, comerciais (como derma-matriz, novogel, entre outras) e com moléculas bioativas (como própolis, peptídeos ultracurtos, entre outros) (Gungor-Ozkerim *et al.*, 2018).

Uma das maiores vantagens dos materiais sintéticos consiste na sua fácil adaptação a um vasto leque de condições e tecnologias de impressão. Porém, assiste-se presentemente a uma demanda por alternativas igualmente eficazes, mas biodegradáveis, biocompatíveis, com o mínimo de efeitos secundários após aplicação, menos dispendiosas e que visem um presente e futuro mais sustentável. Acresce que, quando o propósito de aplicação do material é num organismo vivo, é necessário ter em conta o tipo de complicações a longo prazo (acumulação crónica, toxicidade, efeitos secundários, alergias, entre outros) que a utilização de materiais de origem sintética podem refletir (Qureshi, 2015; Gungor-Ozkerim *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Khoeini *et al.*, 2021; Fatimi *et al.*, 2022; Prete *et al.*, 2023).

Para além das vantagens que a utilização de materiais naturais inegavelmente aporta, cada material terá características próprias, mais ou menos adequadas mediante o propósito do produto final. No âmbito do presente trabalho de investigação podem destacar-se os polímeros naturais quitosano (Ch), colagénio e ácido hialurónico, três dos mais utilizados no desenvolvimento de estruturas para o tratamento de lesões cutâneas (Ashammakhi *et al.*, 2019; Fatimi *et al.*, 2022). O colagénio destaca-se pela sua ação na fase

final de cicatrização, a remodelação, em que existe a necessidade de deposição de colagénio tipo I (Mathew-Steiner *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2022). O ácido hialurónico, por sua vez, atua de forma mais acentuada na fase de angiogénese, auxiliando a proliferação celular no local de lesão durante o processo de cicatrização (Fraser *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2016). O Ch é um dos polímeros naturais usados na impressão 3D com função em todas as fases de cicatrização das lesões cutâneas: desde o seu papel na imunomodulação da resposta inflamatória, a sua capacidade antimicrobiana e, ainda, o seu papel na fase de remodelação do colagénio tipo III, acelerando o processo de angiogénese (Negut *et al.*, 2020).

Bio tintas com Ch mantêm a sua estabilidade mesmo em condições fisiológicas distintas das normais e têm níveis de viscosidade que auxiliam a impressão 3D, principalmente impressão por MEX. Este polímero, conforme referido, apresenta uma variedade de bioatividades, tornando-se uma solução capaz de mimetizar os tecidos da ECM cutânea. Com recurso às várias tecnologias de impressão 3D já foi aplicado para a reconstrução de tecido ósseo, vascular, cutâneo e cartilaginoso (Groeber *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2014; Demirtaş *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Morris *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017; Negut *et al.*, 2020; Sahranavard *et al.*, 2020). No entanto, apresenta algumas desvantagens após impressão como a solidificação mais demorada bem como propriedades mecânicas que refletem força diminuta (Bagheri *et al.*, 2020; Mahmodi *et al.*, 2020).

Materiais com Ch são normalmente finos e com pouca força, desta forma o seu uso deve ser adaptado a estas mesmas características (Bagheri *et al.*, 2020; Mahmodi *et al.*, 2020). Para contornar estes obstáculos, visando a melhoria da estabilidade física e força mecânica, é requerida a junção de um material líquido ou semissólido, possibilitando alargar as suas aplicações e melhorar a sua performance. Concluindo, a utilização direta de Ch, ou de derivados, possivelmente ainda acoplado a outros compostos bioativos, como própolis (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016; Ceylan, 2021) para aplicações em engenharia de tecidos de forma a reconstruir ou substituir tecido cutâneo, ósseo ou cartilaginoso constitui uma abordagem progressiva, vantajosa e multilateral (Tarassoli *et al.*, 2018). Consequentemente, integrar a manufatura aditiva como base no desenvolvimento de novos materiais para o tratamento de lesões cutâneas é uma das abordagens atuais mais inovadoras cuja atenção tem vindo a ser alvo de estudos nos últimos anos. A análise dos trabalhos, estudos e materiais já desenvolvidos permite entender quais os parâmetros mais importantes nesta tarefa tais como a origem dos produtos usados e as suas bioatividades, a sinergia entre esses produtos ou mesmo a técnica de impressão 3D selecionada.

4.3. Integração da impressão 3D como ferramenta de customização no tratamento de feridas cutâneas

A impressão 3D, com as suas vantagens e customizações, afigura-se uma solução viável e perfeitamente lógica para integração no tratamento de feridas cutâneas, conforme relatado até então (Groeber *et al.*, 2011; Tchemtchoua *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013;Morganti *et al.*, 2016; Ramanathan *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018; Rakhshaei *et al.*, 2019; Hidaka *et al.*, 2021; Salahuddin *et al.*, 2021; Pérez-Nava *et al.*, 2022; Antezana *et al.*, 2022). Utilizando o tipo de tecnologia de impressão 3D e as bio tintas com matérias-primas e compostos apropriados para o tratamento de lesões cutâneas, como o Ch e o própolis, é possível desenvolver uma solução que se destaque por contornar os obstáculos que outras abordagens, como pensos, algodão, adesivos têxteis, entre outros, refletem.

A Tabela 3 apresenta alguns exemplos práticos que se assemelham à tecnologia, técnica de impressão 3D, matéria(s)-prima(s) e/ou aplicação utilizadas no presente trabalho, tendo o Ch como polímero natural em todas as formulações.

Tabela 3: *Exemplos de trabalhos de investigação desenvolvidos com base na impressão 3D de produtos com quitosano.*

Produto(s) impresso(s)	Polímero(s) usado(s)	Solvente(s)	Outro(s) composto(s) incorporado(s)	Técnica(s) de impressão	Referência Bibliográfica
Hidrogéis	Ch e derivados de quitosano	HCl		VPP MEX	(Hidaka *et al.*, 2021)
Adesivos	Pectina, Ch,	dH_2O	Extrato de própolis (Grécia), mel (Nova Zelândia), ciclodextrina	MEX	(Andriotis *et al.*, 2020)
Micro/Nanofibras	Ch	Ácido acético	Colagénio, gelatina, celulose, PEO, PVA, PCL e PLGA	Impressão por *eletrospinning*	(Tien *et al.*, 2021)
Scaffold de nanofibras	Ch	Ácido acético	PEG	Impressão por *eletrospinning* e MEX	(Tchemtchoua , *et al* 2011)
Hidrogéis	Gelatina, gelatina metacrilato, Ch	Ácido acético		Impressão por *eletrospinning* e MEX	(Salahuddin *et al.*, 2021; Nagahama *et al.*, 2009)
Filmes de nanofibras	Gelatina, Ch	Ácido acético	PEGDE	MEX	(Altuntas *et al.*, 2019)
Scaffold de nanocompósitos	Ch, gelatina	Ácido acético	ZnO	MEX	(Rakhshaei *et al.*, 2019)

Curativos feitos com base polimérica de Ch surgiram como uma nova classe de materiais que apresentam propriedades superiores em termos de biocompatibilidade, biodegradabilidade, atividade antimicrobiana e porosidade (Tien *et al.*, 2021). Apresentam características chave para aplicação como terapias de lesões cutâneas já que são capazes de fornecer um ambiente ideal, absorvendo exsudatos e simultaneamente acelerando a recuperação da lesão (Antunes *et al.*, 2015).

O Ch foi selecionado como matéria-prima por vários motivos, salientando-se exemplos em que a utilização de *scaffolds* de Ch minimiza consideravelmente complicações no processo de cicatrização cutânea através da impossibilidade de transferência de patógenos causadores de infeções para o material (Amini *et al.*, 2012; Altuntas *et al.*, 2019). Outros estudos comprovam que o teste *in vitro* destes materiais, durante duas semanas, refletem elevados níveis de biocompatibilidade, por constituírem uma solução pouco invasiva, tendo posteriormente revelado a geração de novos vasos sanguíneos e reformação dos tecidos cutâneos suportados pela diferenciação de mastócitos quando testados *in vivo* (Maji *et al.*, 2018; Moreira *et al.*, 2019). Quando comparados os resultados em ensaios *in vitro* e *in vivo*, materiais com Ch na forma de filmes, esponjas e *scaffolds* de nanofibras revelaram ausência de infeção microbiana, capacidade anti-inflamatória, antimicrobiana e imunomoduladora embora os *scaffolds* e filmes de Ch tenham revelado efeito superior no auxilio do processo de angiogénese e cicatrização cutânea em comparação com as esponjas (Tchemtchoua *et al.*, 2011).

Em estudos com inclusão de extrato de própolis na composição da bio tinta de Ch para impressão 3D de curativos foi possível constatar as suas capacidades antimicrobianas e de cicatrização de feridas que se destaca dos demais estudos (Andriotis *et al.*, 2020; Phonrachom *et al.*, 2023). Nestes filmes, após incorporação do própolis, observou-se um aumento de até 95% na atividade antimicrobiana e proliferação celular no processo de angiogénese (Rakhshaei *et al.*, 2019; Andriotis *et al.*, 2020). Estes resultados refletem as vantagens da integração tanto do polímero natural Ch como do composto natural própolis como abordagem promissora para o tratamento/cicatrização de lesões cutâneas. Ademais, a sinergia comprovada entre os dois produtos favorece a sua utilização conjunta, incorporando ambos num produto final (Phonrachom *et al.*, 2023).

5. Motivação e objetivo

Conforme foi mencionado no início deste trabalho, as lesões cutâneas têm vindo a assumir uma importância acrescida pelo elevado impacto socioeconómico na saúde mundial. A procura por soluções mais cómodas para o paciente, menos dispendiosas, de fácil manuseamento, simples e preferencialmente com origem em produtos naturais é uma constante.

Neste contexto, no presente trabalho pretendeu-se combinar as bioatividades do extrato de própolis do Gerês, com a facilidade da manufatura aditiva e propriedades moduladoras do quitosano desenvolvendo um filme antimicrobiano por impressão 3D destinado ao auxílio das diversas fases de cicatrização as lesões cutâneas. Este material será uma solução biocompatível, biodegradável, de origem natural, não tóxica, completamente costumizável no tamanho e forma e que permitirá evitar os algumas das limitações das atuais soluções terapêuticas, nomeadamente a oclusão da lesão, desconforto e limitação do movimento do paciente aquando da troca periódica de material, utilização de diversos materiais e/ou fármacos simultaneamente, efeitos secundários característicos de compostos sintéticos, e infeção microbiana, entre outros.

5.1. Metodologia

Durante a execução do trabalho, e de modo a cumprir os objetivos mencionados anteriormente, foi implementada a seguinte metodologia (Figura 17), dividida em três grandes partes: (1) Análise dos parâmetros de qualidade da amostra de própolis do Gerês usada e preparação e caracterização de um extrato etanólico da mesma; (2) Preparação e otimização da formulação de bio tintas de quitosano, ácido acético e extrato de própolis para impressão 3D; (3) Caracterização dos filmes impressos, que se detalham a seguir:

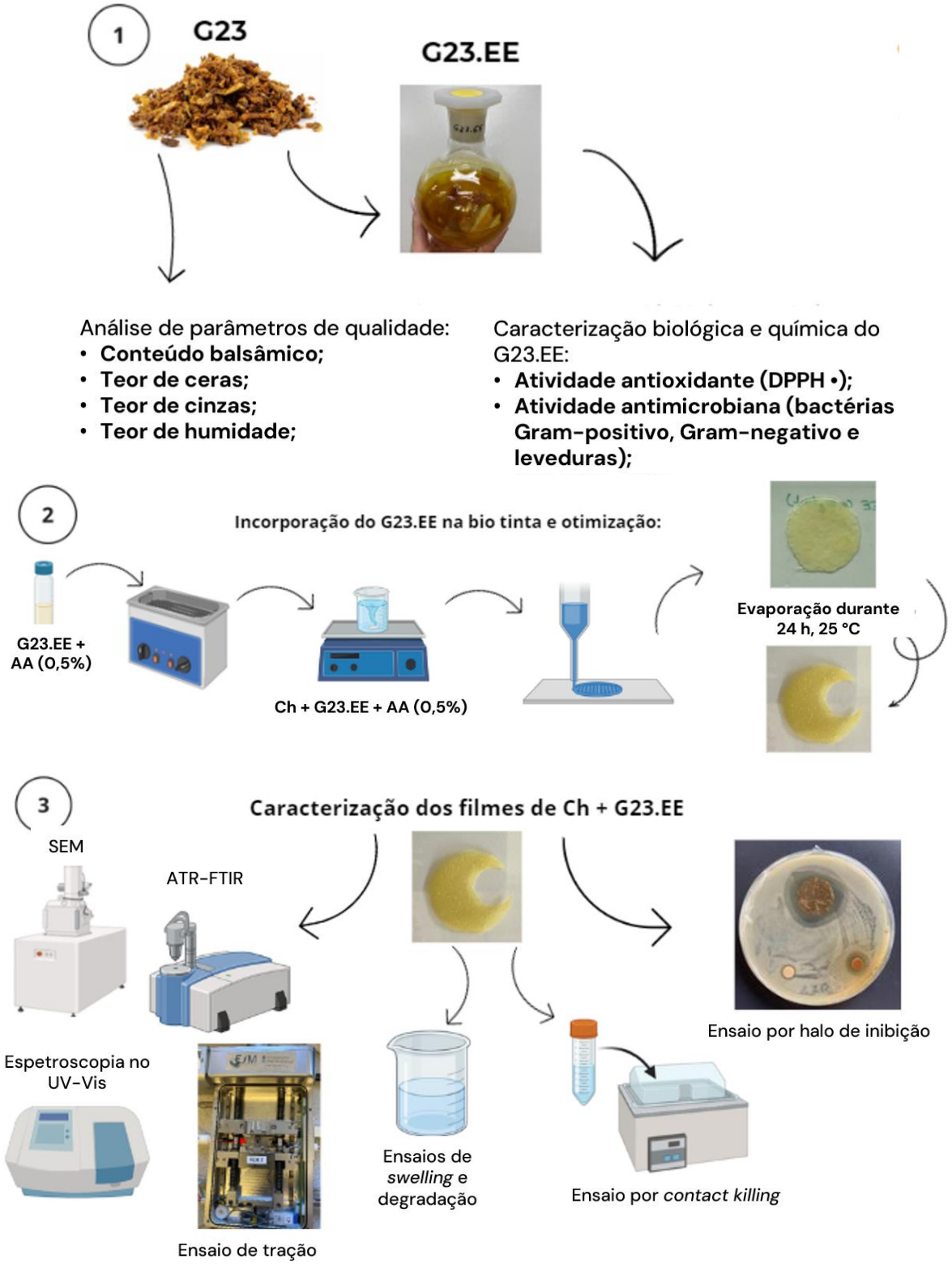


***Figura 17**: Ilustração das três partes constituintes da metodologia do presente trabalho. (**1**) Análise dos parâmetros de qualidade da amostra de própolis do Gerês usada e preparação e caracterização de um extrato etanólico da mesma; (**2**) Preparação e otimização da formulação de bio tintas de quitosano, ácido acético e extrato de própolis para impressão 3D; (**3**) Caracterização dos filmes impressos*

CAPÍTULO II: MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostra de própolis

A amostra de própolis utilizada ao longo deste trabalho foi obtida entre agosto e setembro de 2023, num apiário no Gerês, distrito de Montalegre, em Portugal (41°45′41,62″ N; 7°58′03,34″ W). Este local situa-se no norte do país e é caracterizado pela presença de uma vasta área protegida (Parque Nacional da Peneda-Gerês) a fim de preservar a totalidade da biosfera característica. O própolis do Gerês (G) é obtido com o auxílio de redes plásticas (*BEE Equipment*, Praga, República Checa) colocadas diretamente nas colmeias de três locais distintos do apiário: Felgueiras, Roca e Toutelo. As redes contendo própolis são retiradas das colmeias, guardadas em sacas de plástico e congeladas durante a noite. No fim deste processo são torcidas dentro do saco, libertando o própolis de forma facilitada.

A fim de obter uma amostra o mais similar possível a estudos anteriores (Freitas *et al.*, 2018; Caetano *et al.*, 2023) realizou-se uma limpeza prévia do material com recurso a uma pinça, separando e descartando resíduos sólidos como abelhas, ou fragmentos das mesmas e outros lixos, e pesou-se uma mistura devidamente homogeneizada com quantidades iguais (5 g) (balança digital Mettler PM2000, +/- 0.01 g) de própolis proveniente de cada um dos três locais do apiário citados, originando a amostra do própolis G23, que foi guardada a 4 °C e ao abrigo da luz.

1.1. Caracterização do própolis G23

1.1.1. Conteúdo balsâmico

O conteúdo balsâmico da amostra bruta de própolis G23 foi determinado segundo Popova *et al.* (2007), adicionando 15 mL de etanol 70% (*v/v*) (Fisher Scientific) a 0,53 g de G23 **[B1]** e incubando a mistura num Erlenmeyer de 250 mL durante 24 h ao abrigo de luz, a 24 °C e 125 rpm. Após filtração sob vácuo (conforme descrito posteriormente, na **Secção 2.**) procedeu-se à re-extração dos resíduos da filtração nas mesmas condições repetindo-se o processo de filtração uma segunda vez.

As soluções resultantes das duas filtrações anteriores foram transferidas para um balão volumétrico de 50 mL (+/-0.06 NORMAX, Germany) perfazendo-se o volume do balão com etanol 70%. Foram retiradas três alíquotas de 2 mL desta mistura e procedeu-se à evaporação do solvente sob fluxo de nitrogénio com recurso a uma bomba de nitrogénio (Heidolph Instruments). Após evaporação e pesagem do extrato seco **[B2]** foi calculado o conteúdo balsâmico da amostra $\left[\frac{B2}{B1} \times 100\right]$, tendo sido expresso em percentagem (%, *m/m*). Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

1.1.2. Teor de humidade

O teor de humidade da amostra bruta de própolis G23 foi determinado com base no método referido por Woisky & Salatino (1998), colocando no forno (BINDER ED 23) a 105 °C por 5 h um gobelé de 50 mL, previamente coberto com papel de alumínio, e contendo 4 g de G23 **[H0]**.

Após secagem, o gobelé foi colocado num exsicador para arrefecer durante a noite e novamente pesado **[H1]**. O teor de humidade foi expresso em percentagem (%, *m/m*) e calculado com recurso à expressão $\left[\frac{(H0-H1)}{4} \times 100\right]$. Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

1.1.3. Teor de cinzas

O teor de cinzas de G23 foi determinado usando uma versão modificada do método descrito por Lopes *et al.* (2017). Pesou-se 1 g de G23 **[C1]** num cadinho previamente pesado **[C2]** e de seguida foi colocado para incineração numa mufla (Nabertherm) por 3 h a 550 °C. Após este período, o cadinho foi colocado num exsicador durante a noite, sendo novamente pesado após arrefecimento **[C3]**.

O teor de cinzas foi determinado pela expressão $\left[\frac{(C3-C2)}{C1} \times 100\right]$ e expresso em percentagem (%, *m/m*). Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

1.1.4. Teor de ceras

Para a análise do teor em ceras de G23 foi utilizado um método baseado na diferença de densidade entre o própolis e a cera de abelha, conforme descrito por Hogendoorn *et al.* (2013). Para tal, 1 g de G23 **[Ce1]** foi misturado com 2,5 mL de água desionizada (dH_2O) num Falcon de 15 mL. Aqueceu-se esta mistura em forno de micro-ondas (AMW210, Whirlpool) e, após arrefecimento à temperatura ambiente, surgem três camadas distintas (Figura 18).

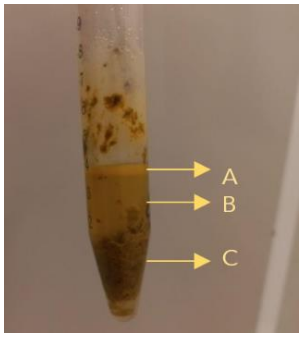


Figura 18: *Camadas formadas após aquecimento da amostra de G23 com dH2O e posterior arrefecimento.* ***A****: cera;* ***B****: água e* ***C****: própolis livre de cera.*

A camada superior foi removida, pesada **[Ce2]** e o teor de cera foi calculado com base na expressão $\left[\frac{Ce2}{Ce1} \times 100\right]$ e expresso em percentagem (%, *m/m*). Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

2. Obtenção do extrato etanólico de própolis do Gerês, G23.EE

Para a extração etanólica foi seguido o procedimento descrito por Freitas *et al.*, (2019), adicionando-se etanol absoluto (Carlo Erba Reagents) numa proporção de 1:5 a 15,11 g de própolis G23. Esta mistura foi mantida num Erlenmeyer de 250 mL devidamente selado e revestido com papel de alumínio sob agitação orbital (125 rpm) durante 24 h a 25 °C (Orbital Shaker SO1, Bibby, Stuart, UK). A mistura foi filtrada para um Kitasato através de filtros de café sobre um funil de *Buckner* (Haldenwanger) e auxiliada por bomba de vácuo (Millipore). O filtrado foi reservado a 4 °C (devidamente protegido da luz) e os resíduos sólidos da filtração foram submetidos a uma nova extração, desta vez adicionando o solvente numa proporção de 1:3,33, e mantendo as condições de incubação atrás referidas. O processo de filtração sob vácuo foi repetido, os filtrados resultantes das duas filtrações reunidos e a solução final foi submetida a uma extração do solvente num evaporador rotativo (Büchi, Rotavapor R-200) a 40 °C e 40 rpm. No fim deste processo foi registado o peso do extrato após secagem ($P_{extrato\ seco}$) e o extrato etanólico de própolis assim obtido - G23.EE - foi mantido a 4 °C e ao abrigo de luz até utilização.

O rendimento do processo de extração foi calculado em % (*m/m*) tendo por base a seguinte fórmula $\left[\frac{Pextrato\ seco}{PG23\ extraído} \times 100\right]$. Foram realizadas 3 réplicas das medições de massa.

2.1. Caracterização química do G23.EE

2.1.1. Determinação do teor de polifenóis totais (TPT)

O teor de polifenóis totais (TPT) foi determinado com base no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Kumazawa *et al.*, 2004). Para este ensaio, 10 µL de G23.EE, 50 µL de Folin-C (Sigma-Aldrich, 1:10) e 40 µL de Na_2CO_3 (Merck, 7,5% p/v) foram adicionados por poço numa placa de 96 poços de forma a obter concentrações de G23.EE de 50 a 300 µL/mL. Para cada concentração, um branco foi preparado com 90 µL de solvente e 10 µL de ácido gálico e etanol (Sigma-Aldrich), bem como um controlo com 10 µL de solvente, 50 µL de Folin-C e 40 µL de Na_2CO_3. Após 1h de incubação no escuro, à temperatura ambiente (25 ° C) a absorvância foi lida a 760 nm. Os resultados foram obtidos por meio da interpolação de regressão linear usando ácido gálico para obtenção da curva de calibração como padrão (1-30 µg/mL). O TPT foi expresso como equivalentes de ácido gálico por gramas de extrato etanólico (mg EAG/g G23.EE). Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

2.1.2. Determinação do teor de flavonóides totais (TFT)

O teor de flavonóides totais (TFT) do G23.EE foi determinado usando o método colorimétrico de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (Woisky & Salatino, 1998). Para este ensaio, numa placa de 96 poços, foram colocados 50 μL de G23.EE com 50 μL de $AlCl_3$ (Acrós, Organics, 2%) originando concentrações de G23.EE de 200 a 1600 μg/mL. Para cada concentração, um branco foi preparado com 50 μL de G23.EE e 50 μL de solvente. Para o controlo foram usados 50 μL de solvente e 50 μL de $AlCl_3$. A absorvância foi lida a 420 nm após 1h de incubação à temperatura ambiente (25 °C). Os resultados foram obtidos por meio de interpolação de regressão linear usando quercetina (Q) para obtenção de curva de calibração como padrão (5-200 μg/mL). O TFT foi expresso como equivalentes de quercetina por gramas de extrato etanólico G23 (mg EQ/g G23.EE). Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

2.1.3. Determinação do teor de orto difenóis total (TOT)

O teor total de ortodifenóis de G23.EE foi determinado pelo método de complexação com molibdato de sódio (Na_2MoO_4) (Acrós Organics) 50 mg/mL, preparado com 50% de etanol, descrito por Mateos *et al.* (2001), com algumas modificações. Foram adicionados 160 μL de G23.EE e 40 μL de Na_2MoO_4 numa placa de 96 poços de forma a obter concentrações de G23.EE de 50 a 300 μg/mL.

Foi usado um branco com 40 μL de etanol 50% (*v/v*) e 160 μL de ácido gálico e um controlo com 160 μL de etanol 50% e 40 μL de Na_2MoO_4. Após 15 minutos a 25 °C a absorvância foi lida a 370 nm. Os resultados foram obtidos por meio de interpolação de regressão linear usando uma curva de calibração de ácido gálico (10-200 μg/mL) e o TOT foi expresso como equivalentes de ácido gálico por massa de extrato (mg GAE/g G23.EE). Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

2.2. Caracterização biológica e química do G23.EE

2.2.1. Avaliação do potencial antioxidante do G23.EE – ensaio de redução do radical livre DPPH•

O potencial antioxidante de G23.EE foi avaliado com base no ensaio de redução do radical livre DPPH• (2,2-difenil-2-picrilhidrazil) (Hatano *et al.*, 1988) com as adaptações referidas por Freitas *et al.* (2019). Inicialmente foi preparada uma solução de trabalho de DPPH• (Sigma-Aldrich) 0,004% (*p/v*), e seis soluções de G23.EE com concentrações entre 1,5 μg/mL e 150 μg/mL. Posteriormente, adicionaram-se 50 μL de cada uma das soluções G23.EE a 100 μL da solução de trabalho de DPPH, numa placa de 96 poços, de forma a atingir concentrações finais de G23.EE entre 1 e 50 μg/mL. Foi utilizado um branco por cada concentração em teste, preparado com 50 μL de extrato e 100 μL de solvente (etanol absoluto) e,

ainda, um controlo com 50 μL do solvente e 100 μL da solução de trabalho. Foi utilizado o ácido gálico (Sigma-Aldrich) como padrão (0,20-1,5 μg/mL; R^2 = 0,9899).

A concentração de G23.EE necessária para eliminar 50% do DPPH inicial -EC50- foi calculada através da expressão $\frac{[Abs\ controlo-(Abs\ amostra-Abs\ controlo)]}{Abs\ controlo} \times 100$ e expressa em μg/mL.

Após preparação das misturas reacionais na placa de 96 poços, procedeu-se à sua incubação no escuro, durante 30 minutos, e à temperatura ambiente seguindo-se a leitura da absorvância a 517 nm (Infinite M Plex, Tecan). Foram realizadas 3 réplicas do ensaio.

2.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana do G23.EE

2.2.2.1. Estirpes, meios e condições de crescimento

Para avaliação deste parâmetro foram utilizadas sete bactérias Gram-positivo: *Bacillus subtillis* 48886, *Bacillus cereus* ATCC 7064, *Bacillus megaterium* 932, *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina ATCC 6538 (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente ao antibiótico meticilina M746 665 (MRSA), *Propionibacterium acnes* H60803 (2961351) e *Stapylococcus epidermidis* CECT 4783/ATCC 35983, uma bactéria Gram-negativo: *Escherichia coli* CECT 423 e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 e *Candida albicans* 53B. Todos estes microrganismos foram provenientes da coleção de microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade do Minho.

Os meios de cultura usados durante todo o processo de manipulação microbiana foram o *Luria Broth* (LB) (Grisp, Research Resolutions) (0,5% *p/v*) de extrato de levedura, 1% (*p/v*) de triptona, 1% (*p/v*) de NaCl) e LBA, ou meio LB suplementado com 2% (*p/v*) de agar (VWR, BHD Chemicals) para as bactérias. Para as leveduras usou-se o meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) (Difco TM, Fisher Scientific) (1% *p/v* extrato de levedura, 2% (*p/v*) de peptona e 2% (*p/v*) de glicose) e YPDA, meio YPD suplementado com 2% (*p/v*) de agar.

As culturas bacterianas e de levedura foram obtidas em meio LB e YPD após incubação a 37 °C e 30 °C, respetivamente, com agitação de 200 rpm. O crescimento da cultura foi monitorizado através de densidade ótica ao comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) até atingir um valor entre 0,1 e 0,4, correspondente a meio da fase exponencial do seu crescimento o.

Para os ensaios antimicrobianos usou-se o meio suplementado com G23.EE nas concentrações de 50, 100, 200, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 μg/mL. Adicionalmente, e como controlo, usou-se apenas meio LBA (bactérias)/YPD (leveduras) e meio LBA (bactérias)/YPD (leveduras) contendo etanol num volume correspondente à concentração mais elevada de G23.EE usada, 2000 μg/mL.

2.2.2.2. Determinação de Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC)

Os valores de MIC (do inglês *minimum inhibitory concentration*) do G23.EE foram determinadas com base num método de diluição em agar (Hanson & Martin, 1978). Em placas de meio sólido – LBA ou YPDA, para bactérias ou leveduras respetivamente, e preparadas conforme descrito na secção anterior, foram inoculadas gotas de 5 μL, em triplicado, de cada uma das várias culturas microbianas em fase de crescimento exponencial (DO_{600} entre 0,4 e 0,6) conforme representado na Figura 19.

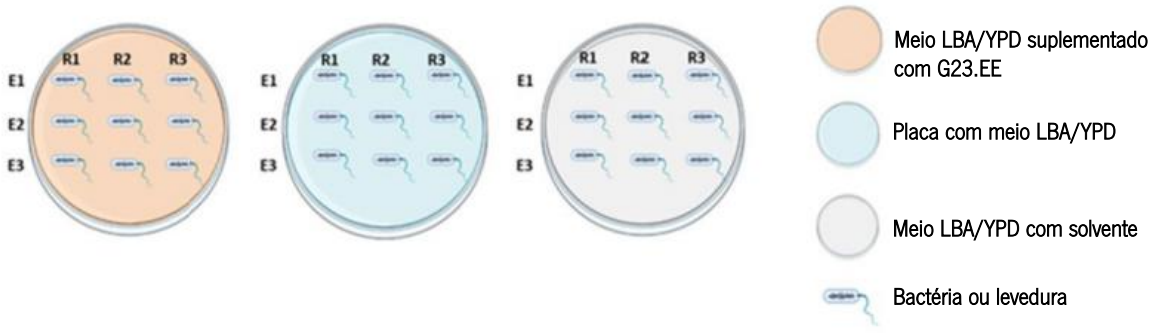


Figura 19: *Representação esquemática do ensaio antimicrobiano para obtenção dos valores de MIC relativos ao G23.EE com as respetivas réplicas e ensaios independentes realizadas para cada microrganismo. R1,R2,R3 representam as réplicas e E1,E2 e E3 representam os ensaios independentes.*

As placas com bactérias e com leveduras foram incubadas a 37 e 30 °C, por 24 e 48 h, respetivamente, e observadas para a presença/ausência de crescimento. A concentração mais baixa em que não foi detetado qualquer crescimento microbiano foi registada como o valor de MIC de G23.EE contra esse microrganismo. Foram realizados 3 ensaios independentes para cada um dos microrganismos testados, cada um deles com 3 réplicas.

3. Processamento dos materiais para impressão 3D

3.1. Materiais e reagentes

Os filmes desenvolvidos neste trabalho são constituídos pelos seguintes reagentes: quitosano ($C_6H_{11}NO_4$) (Sigma Aldrich, 1003345972, SLCH4865, grau de pureza ≥ 75%); ácido acético (AA) 0,5% (CH_3COOH) (Fisher Scientific, grau de pureza > 99,70%) e G23.EE.

3.2. Preparação das bio tintas

Ao longo do presente trabalho foram preparadas várias bio tintas com concentrações distintas (0,08 g/mL, 0,16 g/ml, 0,30 g/mL e 0,50 g/mL) e volume crescentes de G23.EE (2,5%, 5%, 7,5%, 10% e 12,5%, Figura 20B) de forma a testar quais as mais funcionais quer para impressão, capacidade antimicrobiana e propriedades mecânicas. O processo de preparação da bio tinta para impressão encontra-se resumidamente ilustrado na Figura 20.

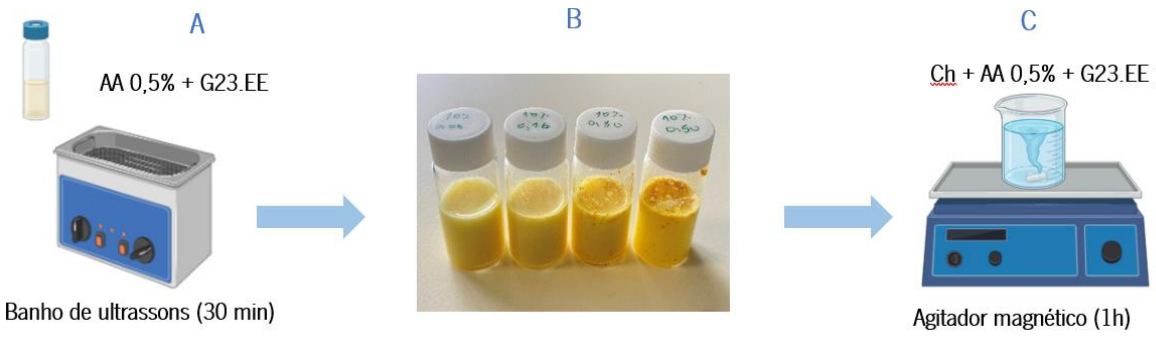


Figura 20: *Representação esquemática do processo de preparação da bio tinta para impressão.* ***A****: Preparação da solução de própolis com AA (0,5%) e banho de ultrassons* ***B****: Soluções após banho de ultrassons* ***C****: incorporação do quitosano na solução e agitação.*

A preparação das bio tintas inicia-se com a adição de AA (0,5%) à amostra de própolis G23.EE. Esta solução foi preparada num recipiente de vidro com tampa e, de seguida, o recipiente é colocado no banho de ultrassons H-D (J.P Selecta) por 30 minutos, à temperatura ambiente, para dispersão e homogeneização do própolis no solvente, evitando aglomerados. Em seguida, a solução é colocada num Erlenmeyer de 10 mL, com um magnete, sobre uma placa de agitação magnética (AREC.X VELP Scientific). Procedeu-se de seguida à adição gradual de Ch, sob a forma de pó, à solução, com agitação magnética na velocidade mais reduzida possível, evitando a formação de bolhas na formulação. O processo de agitação magnética deve ser mantido, no mínimo, durante 1 h, garantindo a dissolução completa do polímero e completa homogeneização com o extrato de própolis e solvente.

3.2.1. Otimização da formulação

Para alcançar a formulação com as propriedades que permitissem a sua impressão 3D, foi necessário um processo de otimização na quantidade/concentração dos diversos compostos. Inicialmente foram apenas impressos filmes com concentrações distintas de Ch: 2%, 2,5%, 3%, 3,5% e, ainda 4%. Nesta fase apenas foi adicionado o Ch ao seu solvente, AA 0,5%, num gobelé em agitação magnética. Através desta primeira análise constatou-se que apenas as formulações poliméricas com 2,5%, 3% e 3,5% de Ch conseguiam ser impressas mantendo a forma desenhada por *software* e, simultaneamente, não ficando presas na seringa pela sua elevada viscosidade.

O passo seguinte foi a inserção, gota a gota, do G23.EE em diferentes concentrações: 0,08 g/mL; 0,16 g/mL; 0,30 g/mL e 0,50 g/mL (Figura 21). O extrato foi então adicionado (testando cada uma das soluções anteriormente citadas) na bio tinta em diferentes volumes: 2,5%, 5%, 7,5%, 10% e 12,5%.



***Figura 21**: Soluções de G23.EE usadas para impressão dos filmes poliméricos. A: 0,08 g/mL; B: 0,16 g/mL; C: 0,30 g/mL; D: 0,50 g/mL*

Depois de combinar o G23.EE com AA devidamente processado no aparelho de ultrassons foi possível perceber que a sua adição liquidificava consideravelmente a bio tinta, e que, portanto, a única concentração de Ch que mantinha a viscosidade ideal para impressão, mesmo após adição do G23.EE, foi 3%. Desta forma, conforme ilustrado na Figura 22, às várias soluções de AA (0,5%) com 2,5%, 5%, 7,5% 10% e 12,5% de G23.EE em concentrações crescentes foi adicionado Ch na concentração considerada ideal, 3%.

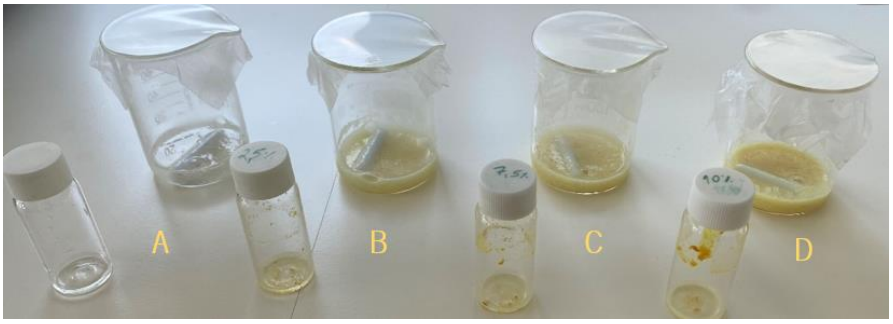


***Figura 22:** As quatro bio tintas usadas para testes de impressão após otimização. **A**: 0,08 g/mL; B: 0,16 g/mL; C: 0,30 g/mL; D: 0,50 g/mL*

Nesta fase já era visível a alteração de tonalidade conforme o aumento da concentração do extrato em cada bio tinta.

3.3. Impressão e secagem das formulações

O processo de impressão inicia-se no desenvolvimento de um ficheiro *G-code*, com recurso ao software *Simplify3D*, contendo os parâmetros de impressão. Na Figura 23 encontra-se representado um esquema da impressora 3D e do processamento da técnica de MEX na seringa.

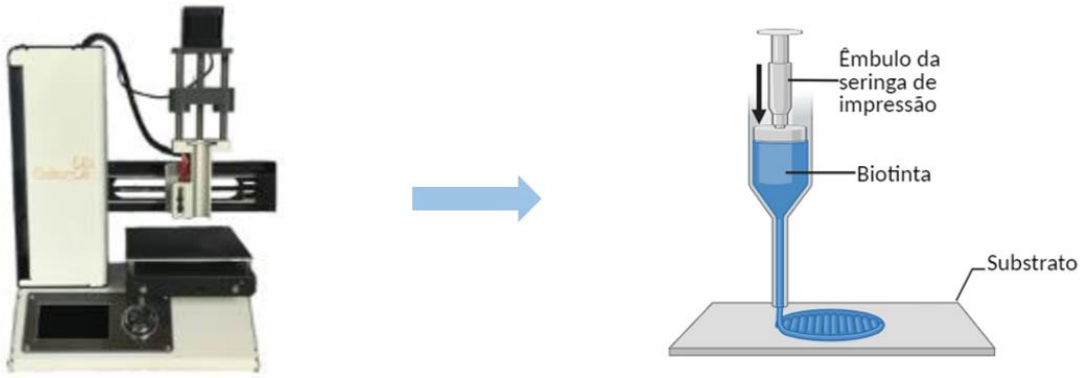


Figura 23: *Representação esquemática da impressora e extrusão da bio tinta da seringa usadas para impressão das amostras.*

As formulações preparadas foram vertidas para o tambor de uma seringa de 10 mL (BD Plastipak) acoplada com uma agulha número 16 (1,20 ± 0,05 mm de diâmetro interno). Esta seringa foi posteriormente colocada numa impressora *TissueScribe* (Cultur3Ds) onde se inicia o processo de impressão que tem a duração de aproximadamente 1 minuto para cada membrana completa de apenas uma camada. O ficheiro específico desenvolvido para a impressão de filmes com a composição acima citada apresenta um preenchimento de forma (*infill*) de 80% com distância entre linhas de 1 mm. O material sobre o qual a bio tinta é impressa para posterior secagem é uma placa de Petri de poliestireno (PS) e não é necessária a aplicação de temperatura no extrusor ou no substrato para que a impressão ocorra. Por fim, os filmes secam em aproximadamente 24 h à temperatura ambiente (25 °C), preferencialmente num local resguardado e sem luz. Relativamente ao processo de secagem das membranas, durante o processo de otimização deste trabalho, foi testada ainda a alternativa de secagem por liofilização.

4. Caracterização dos filmes poliméricos

4.1. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM, do inglês *scanning electron microscope*), representada na Figura 24, é uma técnica analítica, não destrutiva, de elevada resolução espacial (1 nm) amplamente usada na caracterização da superfície de materiais à escala micro e nanométrica. Esta técnica permite obter o mapeamento 3D da superfície do material e, consequentemente, informações relativas à distribuição e morfologia de grãos/bolhas/partículas/irregularidades na mesma. Desta forma, os resultados nesta análise permitem obter informações sobre a estrutura e morfologia da matriz, através de uma imagem superficial amplificada (Smith & Rosa, 1998).

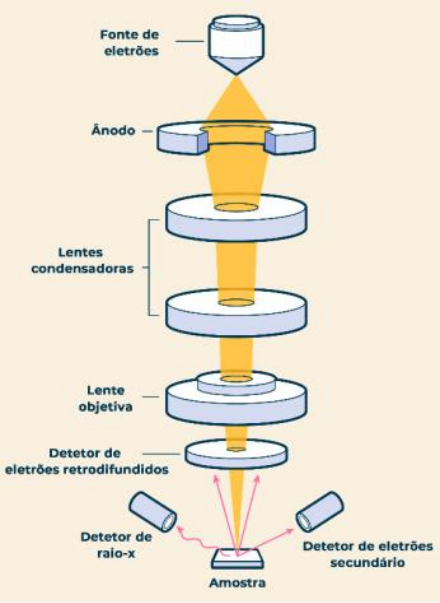


Figura 24: *Esquema de funcionamento da técnica SEM. Retirado de Technology Network Website*

O seu funcionamento tem por base a emissão de um feixe de eletrões produzido por uma diferença de potencial sobre a amostra numa região específica. Com o auxílio de um sistema ótico eletromagnético varre a região de interesse devido à deflexão do feixe de eletrões. A interação dos eletrões com os átomos na superfície da amostra gera um conjunto de eletrões difratados, ou de *Auger*. Por sua vez, estes eletrões emitidos são captados por um conjunto de detetores, fornecendo informações relativas à morfologia e composição química das amostras (Akhtar *et al.*, 2018; Ananthapadmanaban, 2018; Goldstein *et al.*, 2018).

Os filmes desenvolvidos no presente trabalho foram imersos em nitrogénio e revestidos com uma fina camada de ouro antes de serem avaliados por SEM. De seguida as amostras foram quebradas de forma

que fossem obtidas imagens com a análise superficial dos filmes e de secção de corte dos mesmos. Por fim, todas as amostras foram colocadas num *PhenomProx*, um suporte com fita de carbono, e analisadas com uma voltagem de 10 kV.

4.2. Espetroscopia de Infravermelhos em Modo de Refletância Total Atenuada

A espetroscopia de infravermelhos em modo de refletância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *fourier transform infrared spectroscopy – attenuated total reflectance*) é uma técnica de caracterização não destrutiva capaz de fornecer informações acerca das ligações químicas e presença de grupos funcionais num determinado material. O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na incidência de um feixe de radiação infravermelha (entre os 4000 e 400 cm^{-1} na região do espetro eletromagnético) sobre uma amostra. Esta por sua vez é posicionada sob um cristal ATR (do inglês *Attenuated Total Reflectance*, por exemplo diamante) e de seguida a radiação incidente na amostra interage com a mesma, sendo refletida no interior do cristal (Figura 25), atenuando à medida que vai sendo absorvida pelos grupos funcionais específicos presentes na amostra. Esta frequência da radiação é, então, captada por um detetor de infravermelhos (IV) que regista as frequências de absorção características destes grupos funcionais, obtendo-se como resultado um espetro de absorção IV (Thiele & Salzer, 2003; Ramer & Lendl, 2006; Ausili *et al.*, 2015).

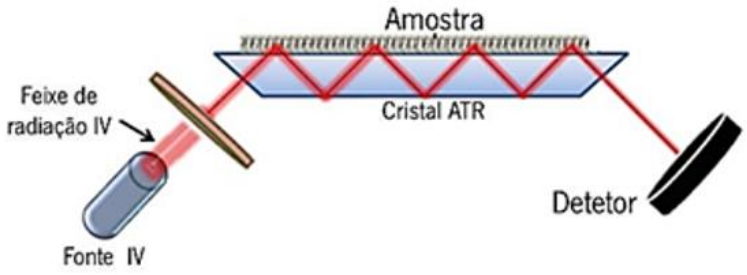


Figura 25: *Esquema representativo do funcionamento de ATR-FTIR. Retirado de Ausili et al., (2015)*

As amostras não precisaram de preparação prévia. Os ensaios ATR-FTIR foram realizados com recurso ao aparelho SpectrumTwo, Perkinelmer nos comprimentos de onda entre 4000 e 600 cm^{-1} e com resolução de 4 cm^{-1}.

4.3. Ensaio de inchamento

Os ensaios de inchamento (*swelling*) foram efetuados com o propósito de avaliar a variação de massa das amostras quanto imersas num determinado meio aquoso durante um intervalo de tempo específico. Para alcançar este objetivo foram usados dois meios aquosos, dH_2O e PBS (tampão fosfato-salino, do inglês *phosphate-buffered saline)* 1% (*v/v*). Os ensaios foram efetuados em gobelés de 50 mL para todas as amostras testadas, com massa inicial entre os 0,0076 g e 0,0238 g.

As amostras foram totalmente imersas no meio aquoso, sem agitação mecânica ou aquecimento (a ±25 °C), tendo sido medida a sua massa (balança Sartorius Quintix 224-1S) após 10, 20, 40, 60 minutos e após 2,7 e 24 h. Adicionalmente, registou-se o peso das amostras após 11 e 21 dias. Cada vez que a amostra foi retirada para se aferir o peso, foi usada uma pinça e cada face foi cuidadosamente pousada sobre uma folha de papel absorvente, de forma a remover o excesso de líquido das superfícies dos filmes. Na Figura 26 encontra-se um exemplo representativo das alterações visíveis numa das amostras ao longo do ensaio.

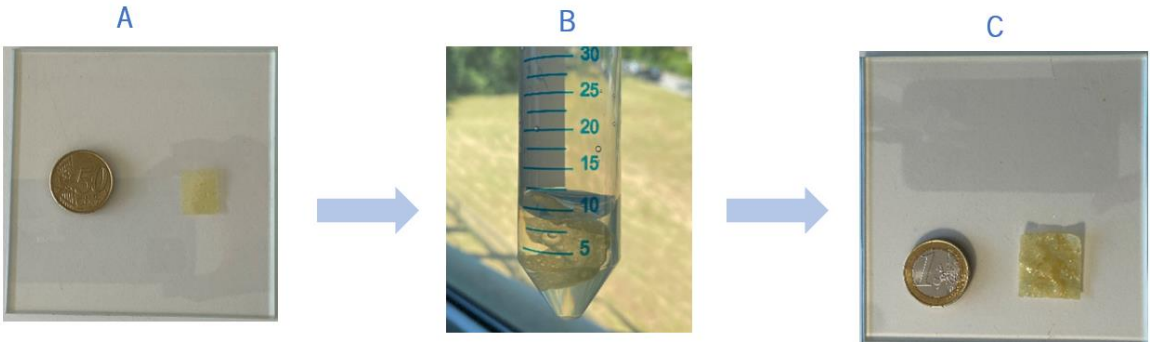


Figura 26: *Representação ilustrativa das alterações visíveis de uma das amostras ao longo do ensaio de swelling. Amostra (**A**) antes do ensaio; (**B**) submersa em meio líquido; (**C**) depois de retirada do meio, seca e pronta para pesagem*

A percentagem de inchaço das amostras foi determinada através da seguinte equação:

$$\% \text{ inchaço} = \frac{m - m_0}{m_0} \times 100$$

Onde m corresponde à massa da amostra no final do ensaio e m_0 à massa inicial da amostra antes de entrar em contacto com o meio líquido (Suriyatem *et al.*, 2018).

4.4. Ensaio de degradação

O ensaio de degradação tem como objetivo avaliar a perda de massa das amostras ao longo do tempo, ou seja, a sua degradação quando em contacto com um meio líquido, no caso dH_2O e PBS (1%, *v/v*) (Suriyatem *et al.*, 2018). Os ensaios foram efetuados em gobelés de 50 mL para todas as amostras testadas, com massa inicial entre os 0,0095 g e 0,0283 g.

As amostras foram totalmente imersas nos meios líquidos à temperatura ambiente (25 °C). A massa das amostras foi pesada com recurso a uma balança (Sartorius Quintix 224-1S) após 1,7, 19, 29 e 30 dias de imersão, num procedimento semelhante ao descrito na Secção 4.3.

A percentagem de degradação das amostras foi determinada através da seguinte equação:

$$\%\ \text{degradação} = \frac{\text{m-m}_0}{\text{m}_0} \times 100$$

Onde, m corresponde à massa da amostra no final do ensaio e m_0 é a massa inicial da amostra antes de entrar em contacto com o meio líquido (Suriyatem *et al.*, 2018).

4.5. Ensaio de tração

A resistência mecânica das amostras produzidas no presente trabalho foi avaliada em ensaios de tração, amplamente usados para avaliar propriedades mecânicas como o módulo de elasticidade, coeficiente de *Poisson*, tensão máxima e deformação até rotura. Estas propriedades permitem compreender e prever o comportamento do material aquando da ação de forças sobre o mesmo durante o exercício da sua função. O ensaio é destrutivo, sendo realizado até que seja atingida rutura total de cada amostra (Saba *et al.*, 2019). O ensaio foi realizado no aparelho representado na Figura 27 (Linkam) a uma velocidade de 5 μm/s e à temperatura ambiente (25 °C).

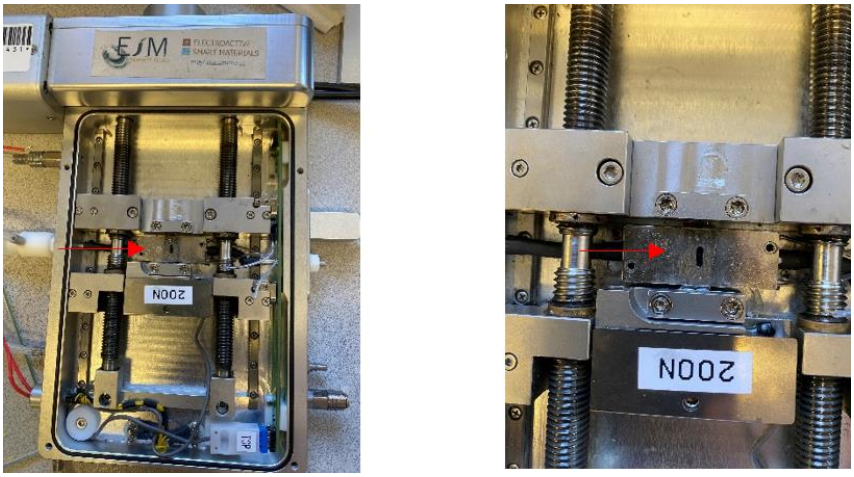


Figura 27: *Equipamento (Linkam) utilizado para a realização dos ensaios de tração com célula de carga de 20 N. Nas imagens encontra-se assinalado com setas o local de inserção da amostra para análise*

Para cada amostra em análise foram usadas secções retangulares dos filmes cuja medida da largura e espessura foi previamente retirada com auxílio de um micrómetro, sendo estes dados introduzidos no *software* do aparelho. Com os dados obtidos foi realizado um tratamento de dados prévio seguido da elaboração de gráficos de tensão/deformação.

4.6. Ensaio de espetroscopia no UltraVioleta-Visível (UV-Vis)

Este ensaio tem como objetivo avaliar as propriedades óticas dos filmes de Ch e própolis e o seu funcionamento encontra-se ilustrado no esquema da Figura 28.

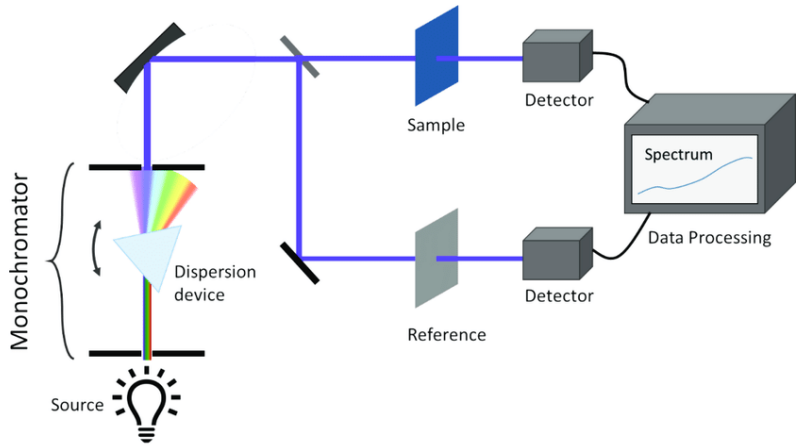


Figura 28: *Esquema representativo do ensaio de UV-Vis. Retirado de S. Han, (2019)*

O ensaio tem por base interações da luz e matéria, através da incidência de um feixe de luz com comprimento de onda na gama UV-Vis (com recurso a um monocromador). Alguns destes comprimentos de onda serão, ou não, absorvidos pelas moléculas da amostra, diminuindo a intensidade da luz que é detetada num detetor localizado depois da amostra. Por sua vez, o detetor mede a quantidade de luz transmitida pela amostra e converte-a em valores de absorvância ou transmitância (Ouidad *et al.*, 2020; Shaik *et al.*, 2021).

4.7. Ensaios antimicrobianos

4.7.1. Ensaios para deteção de halos de inibição

Após impressão e secagem, os filmes foram retirados dos substratos e sujeitos a 15 minutos de radiação UV em cada uma das faces, sendo de seguida cuidadosamente colocados, com o auxílio de uma pinça estéril, sobre uma placa com meio LBA previamente inoculada com uma suspensão bacteriana. Neste ensaio foi utilizada como indicador de suscetibilidade a bactéria Gram-positivo *B. subtillis* 48886 previamente cultivada e a uma DO_{600} entre 0,4 e 0,6. Na mesma placa foram colocados dois discos de papel, um contendo 20 µL de G23.EE e o segundo 20 µL de EtOH 100%. Os volumes a usar, quer de extrato, quer de solvente, foram calculados tendo em conta tanto a área das amostras como o volume de G23.EE presente em cada amostra impressa. Após incubação durante 24 h a 37 °C, verificou-se a presença e o tamanho/forma do halo de inibição que rodeava a amostra (Bermeo *et al.*, 2019; Leal, 2019), procedendo-se à medição do seu diâmetro em, pelo menos 3 locais distintos de cada halo.

4.7.2. Ensaio por contact killing ou morte por contacto

Para a realização deste ensaio foi utilizada a bactéria Gram-positivo *S. aureus* ATCC 6538 (MSSA). O objetivo deste ensaio é promover o contacto direto de uma suspensão bacteriana com a amostra em análise durante algum tempo, de forma a percecionar o efeito deste material no crescimento/desenvolvimento do microrganismo.

Uma cultura microbiana preparada como descrito no **CAPÍTULO II, Secção 2.2.2.1.**, foi ressuspendido em meio LB após duas lavagens com NaCl (Braun, 0,9%, (*p/v*)). A DO foi medida a 600 nm e ajustada para 0,36 ± 0,01, originando um inóculo com aproximadamente 6,1 x 10^9 UFC/mL. A atividade antimicrobiana foi então avaliada de acordo com o método ASTM-E2149-01 (Mestre, 2014) com algumas modificações. Após esterilização sob radiação UV, durante 15 minutos em cada face, as amostras foram passadas para Falcons estéreis com 3 mL da suspensão bacteriana e incubados por 2 h sob agitação a 37 °C. De seguida, as amostras foram lavadas em 3 mL de NaCl (0,9%, *p/v*) e agitadas num vórtex, durante 30 segundos. Adicionaram-se 180 µL de NaCl (0,9%, *p/v*) a uma placa de 96 poços e realizaram-se diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6}. De seguida foram inoculadas gotas de 20 µL correspondentes a cada diluição em placas com meio LBA, e, por fim, as placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C.

A atividade antimicrobiana é estimada através da percentagem de redução bacteriana, calculada como a razão entre o número de bactérias sobreviventes após o contacto com as amostras e antes desse contacto. Os resultados foram expressos posteriormente calculando o Log_{10} da redução bacteriana. Todos os resultados representam valores médios ± DP (n = 3) (Brito-Pereira *et al.*, 2024).

CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Parâmetros de qualidade do própolis G23

Para avaliar os parâmetros de qualidade (teor balsâmico, aquoso, de cinzas e de ceras) do própolis na amostra bruta G23 foram usados os métodos anteriormente descritos (CAPÍTULO II: Secções 1.1.1. a 1.1.4.) obtendo-se os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: *Teor balsâmico, de humidade, de cinzas e de ceras da amostra de própolis G23. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP) (p < 0,05) de pelo menos 3 réplicas de cada ensaio de caracterização do G23.*

Parâmetro	% (*m/m*)
Teor balsâmico	47,17
Teor aquoso	4,86 ± 0,03
Teor de cinzas	0,94 ± 0,04
Teor de ceras	5,08 ± 0,52

Com o intuito de avaliar o própolis G23 como um produto natural de qualidade, os resultados apresentados acima são de elevada importância. Sendo a introdução deste produto natural em setores industriais e de saúde altamente relevante, o estabelecimento de parâmetros de qualidade, padronizados, é imperativo e, pode até afirmar-se, tão importante como os resultados de ensaios de caracterização química do próprio extrato (Sauri-Duch *et al.*, 2021). Na ausência de regulamentos nacionais ou internacionais reconhecidos, a avaliação da qualidade do própolis permite que seja feita uma avaliação sobre a pureza geral do material para posterior aplicação, centrando-se na aferição dos quatro parâmetros: teor balsâmico, aquoso, de cinzas e de ceras (Woisky & Salatino, 1998; Conceição, 2010; Salatino *et al.*, 2011; Vilas-Boas *et al.*, 2017; Caetano *et al.*, 2023).

Para a discussão e avaliação destes parâmetros de qualidade foram tidos em conta trabalhos realizados em anos anteriores em amostras de própolis da mesma origem geográfica (Caetano, *et al.*, 2023). Através da presente análise podemos afirmar que a amostra de G23, indo de acordo com as testadas anteriormente, apresenta teores de cinzas e de ceras abaixo dos valores máximos especificados na literatura para o própolis português/europeu (2% e 25%, respetivamente) (Falcão *et al.*, 2013), bem como os permitidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Própolis (TRIQ) (5% e 25%, respetivamente) (Conceição, 2010; Kasote *et al.*, 2022). Relativamente ao teor de cinzas é importante que seja mantido abaixo do valor

recomendado já que um valor elevado podem sugerir a presença de impurezas orgânicas ou contaminação (Farida *et al.*, 2023). Para além disso, uma das práticas mais comuns de modificação do própolis para fins comerciais é a produção de um pó adulterado de argila com resíduos de extrações anteriores de própolis ao invés de própolis "fresco". Desta forma, a determinação do teor de cinzas da amostra e a manutenção do seu valor dentro dos limites permitidos contorna esta problemática (Woisky & Salatino, 1998). Da mesma forma, o teor de ceras deve ser mantido entre os valores requeridos, já que valores elevados deste parâmetro podem ser indicativos de um processamento deficiente da amostra, contaminação e/ou, ainda, estar associados a amostras com menor quantidade de compostos bioativos (Woisky & Salatino, 1998; Correa-González *et al.*, 2019; Wojtacka, 2022). Ademais, a literatura indica que em extrações etanólicas são obtidos extratos com menos ceras. Este facto é especialmente importante se o produto for usado em zonas frias, onde as ceras podem precipitar e alterar a formulação do própolis (Woisky & Salatino, 1998).

No que concerne ao teor aquoso a amostra de G23 não processada apresenta um valor dentro dos limites aconselhados na literatura para o própolis português (≤ 5%) e pelo TRIQ (≤ 8%). O mesmo não ocorreu nos anos anteriores (G19,20 e 22) cujos valores foram, respetivamente 6,56 ± 0,19; 6,23 ± 0,02 e 5,90 ± 0,35 (Caetano, *et al.*, 2023). Este parâmetro pode ser altamente influenciado por fatores como o manuseamento da amostra e, principalmente, o tempo de armazenamento (Falcão *et al.*, 2013). Valores elevados do teor de humidade em amostras de própolis podem, portanto, estar associados ao facto da amostra não ter sido analisada aquando da sua recolha, tendo sido armazenada previamente a 4 °C. A análise deste parâmetro na amostra G23 foi feita menos de um mês após a sua receção no laboratório.

Por fim, o teor balsâmico é um dos parâmetros mais importantes da análise qualitativa do própolis (Falcão *et al.*, 2013, 2019). G23 apresentou um teor balsâmico em consonância com o estabelecido para o própolis europeu (≥ 45%) (Caetano, *et al.*, 2023). Com efeito, elevados teores balsâmicos estão relacionadas com menores teores em ceras e, portanto, uma quantidade reduzida de compostos insolúveis, facilitando a extração do própolis (Popova *et al.*, 2007). Ademais, amostras de própolis com valores elevados de teor balsâmico estão normalmente associadas a amostras com maiores quantidades de compostos biológicos ativos (Kujumgiev *et al.*, 1999; Popova *et al.*, 2007; Çelemli *et al.*, 2019).

Concluindo, tendo em conta a análise dos valores apresentados na Tabela 4 em relação aos parâmetros de qualidade de G23 podemos afirmar que a amostra atende aos parâmetros indicados estabelecidos pela literatura (Falcão, *et al.*, 2013; Vilas-Boas *et al.*, 2017), podendo considerar esta amostra com potencial para utilização futura. É ainda possível afirmar que, comparando com os valores de análise dos mesmos parâmetros em amostras de anos anteriores, apesar de alguma variabilidade, que se considera normal em

amostras naturais, é notória a manutenção de um nível básico de consistência nestas amostras de própolis do Gerês ao longo do tempo, destacando-as relativamente a um dos mais importantes pontos relacionados à aplicação futura deste composto na escala industrial (Caetano, *et al.*, 2023).

2. Obtenção do extrato G23.EE

O extrato G23.EE encontra-se representado na **Figura 29** e o seu processo de extração, realizado conforme descrito no **CAPÍTULO II: Secção 2.**, apresentou um rendimento de 76,5%.



Figura 29: *Extrato G23.EE após secagem no evaporador rotativo*

Para avaliar e comparar este resultado com outros presentes em literatura ou realizados com o mesmo método é importante perceber que este resultado diz respeito a uma avaliação de rendimento tendo em conta somente as diferenças de massa do própolis antes e depois da extração. Desta forma, comparando 5 métodos de extração distintos, segundo Bankova *et al.*, 2021 e Trusheva *et al.*, 2007 a utilização de solventes etanólicos para extração de própolis é a mais indicada e apresenta melhores resultados no extrato final condições de extração similares às que foram usado no presente trabalho. Adicionalmente, também já foi relatado que, a mistura de etanol com água como solvente para extração de própolis permite também a extração de alguns compostos hidrofílicos, sem comprometer grandemente o rendimento da extração (Trusheva *et al.*, 2007). Sabe-se também que, na generalidade, o aumento da percentagem de etanol no solvente aumenta proporcionalmente o rendimento de extração (Monroy *et al.*, 2017; Zin *et al.*, 2018).

De entre os vários estudos encontrados que comparam os diferentes solventes e métodos de extração de própolis destaca-se o estudo de Bankova *et al.*, (2021) que indica que, o solvente cuja extração em própolis do choupo tem maiores quantidades de compostos bioativos e melhor rendimento é etanol 70% (1:10 (*m/V)*) (rendimento de 55%, teor total de flavonóides 28%, teor total de fenóis 43%, capacidade antioxidante e antimicrobiana). Estes resultados são comparados com os de uma outra extração de própolis do choupo com etanol 80% (1:10 (*m/V*)) que apresentou menores quantidades de compostos bioativos e

menor rendimento (rendimento de 38%, teor total de flavonóides 600 μg/mL, teor total de fenóis 1247 μg/mL, sem destaque para a atividade antimicrobiana e antioxidante).

Foi igualmente avaliado o rendimento da extração de própolis tendo em conta diversos tempos e temperaturas de incubação, tendo-se concluído que a extração de *Soxhlet* de 4-6 h a 60 °C com etanol absoluto (5:150 p/v) apresentou um extrato com valor de rendimento superior e maior quantidade de compostos flavonóides e fenóis (Biscaia & Ferreira, 2009; Paviani *et al.*, 2013; Monroy *et al.*, 2017). No entanto, as condições de incubação descritas neste método devem ser utilizadas cautelosamente pois a exposição prolongada do própolis a altas temperaturas pode por em causa a estabilidade dos seus compostos termossensíveis, além de aumentar a solubilidade dos compostos cerosos (Cunha *et al.*, 2004; Biscaia & Ferreira, 2009; Paviani *et al.*, 2013). Por conseguinte, é recomendado o aumento de tempo de incubação e consequente diminuição de temperatura (no máximo 40 °C) de forma a que sejam mantidas todas as capacidades bioativas do extrato de própolis, respetivos compostos e parâmetros de qualidade para futura aplicação (Archaina *et al.*, 2015; Zin *et al.*, 2018).

Desta forma, tendo em conta quais as condições e solvente de extração mais indicados para extração de própolis é possível, ainda, comparar o rendimento do G23.EE (76,5%) com o de outros extratos realizados no mesmo ano. A partir da mesma amostra de própolis (G23) foram realizados um total de 3 extrações para realização do presente trabalho, usando o mesmo solvente e método de extração. Os valores de rendimento obtidos foram 70,6% e 73,8% . Ainda, para um outro trabalho de pesquisa (Mendes, Nuno, n.p.), foi produzido um outro extrato com o mesmo tipo de própolis, mas com um solvente hidroalcoólico 70% *v/v* (G23.EE_{70}) cujo rendimento foi 73,57%. Apesar das diferenças entre os valores apresentados pode considerar-se que, como nenhum dos rendimentos foi inferior a 70%, o método de extração mostra-se consistente e funcional.

3. Caracterização química e biológica do extrato G23.EE

3.1. Determinação do teor de flavonóides, polifenóis e ortodifenóis total do G23.EE

Para avaliar o TPT, TFT e TOT foram usados respetivamente os métodos: colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* (Kumazawa *et al.*, 2004), cujo resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico por massa de extrato (mg GAE/g G23.EE), de cloreto de alumínio (Woisky & Salatino, 1998), cujo resultado foi expresso como equivalentes de quercetina (mg QE/g G23.EE) e o método de complexação com molibdato de sódio (Mateos *et al.*, 2001), com algumas modificações, e cujo resultado foi expresso como equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g G23.EE). Todos os resultados encontram-se na Tabela 5 e são apresentados como média ± DP (n ≥ 3).

Tabela 5: *Conteúdo de polifenóis (TPC), flavonóides (TFC) e de orto-difenóis (TOT) totais determinado para G23.EE.*

Parâmetros de caracterização química	G23.EE
TPT (mg GAE/ g extrato)	142,57 ± 5,60
TFT (mg QE/ g extrato)	28,34 ± 1,98
TOT (mg GAE/ g extrato)	273,48 ± 11,28

A composição química do própolis influencia radicalmente a sua atividade biológica, no entanto, mesmo em amostras de própolis com diferentes origens e com composições químicas distintas destacam-se bioatividades similares (Bankova, 2005). As propriedades farmacológicas e bioatividades do própolis têm sido frequentemente atribuídas, maioritariamente, aos seus compostos fenólicos e em particular aos flavonóides. O própolis português tem vindo a revelar quantidades relevantes destes compostos, tais como ácidos fenólicos, ácidos aromáticos e os seus ésteres (Miguel *et al.*, 2010; Segueni *et al.*, 2021; Wieczorek *et al.*, 2022). Desta forma, a caracterização química e avaliação de compostos fenólicos, flavonóides e até orto-difenóis através de métodos de análise colorimétrica em extratos de própolis é uma prática comum (Vilas-Boas *et al.*, 2017; Escriche & Juan-Borrás, 2018; Segueni *et al.*, 2021).

De entre as várias bioatividades atribuídas ao própolis as capacidades antimicrobiana e antioxidante destacam-se por serem altamente associadas ao conteúdo total de compostos flavonóides e fenólicos. Parte da estrutura química destes compostos possui a capacidade de neutralizar radicais livres. Para além disso, o tipo, origem e/ou solvente do extrato de própolis podem originar diferentes quantidades de compostos fenólicos e flavonóides (Sulaeman *et al.*, 2019; Segueni *et al.*, 2021).

De acordo com vários estudos realizados a comparação dos valores de TPT e TFT em extratos aquosos e etanólicos comprovam que os segundos apresentam valores superiores (Mello *et al.*, 2010; Mello & Hubinger, 2012; Sun *et al.*, 2015). Existem ainda estudos comparativos que estabelecem uma forte correlação entre os conteúdos totais de polifenóis e flavonóides com a capacidade antimicrobiana em extratos de própolis (Silva *et al.*, 2006; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Bonvehí & Gutiérrez, 2012). Desta forma é altamente relevante a inclusão deste tipo de análise nestes extratos para que sejam avaliados segundo o maior número de bioatividades possível. Existem ainda autores que defendem a integração da caracterização química como um parâmetro de qualidade (Popova *et al.*, 2004). No presente trabalho, foram tidas em consideração análises de extratos de própolis com diferentes origens geográficas, mas com os mesmos métodos colorimétricos de análise e, ainda, análises de extratos com a mesma origem geográfica de anos anteriores e os mesmos métodos de análise (G19.EE - G22.EE) (El Sohaimy & Masry, 2014; Sulaeman *et al.*, 2019; Segueni *et al.*, 2021; Caetano *et al.*, 2023). Esta comparação de valores permite-nos inferir o alinhamento dos resultados apresentados na Tabela 5 com aqueles encontrados em literatura, tendo sobressaído o valor de TFT quando comparado com outros extratos de própolis do choupo, no caso proveniente da Europa (Al-Ani *et al.*, 2018).

Em relação ao estudo realizado em anos anteriores, destaca-se a manutenção geral dos valores de TFT e TPT demonstrando a constância de compostos bioativos ao longo dos anos. As alterações observadas podem ser, principalmente, devido à flora visitada pelas abelhas ser distinta ao longo do tempo, bem como a mistura de própolis para obter as amostras dos extratos analisados ao longo dos anos ser de diferentes locais do apiário, o que é particularmente relevante face a eventos naturais incontroláveis, nessas áreas em particular, como incêndios, que levam à extinção de algum dos locais de recolha de própolis (Caetano, *et al.*, 2023).

A análise dos orto-difenóis é uma abordagem recentemente avaliada em extratos de própolis (Farida *et al.*, 2023). A sua relevância surge pela correlação com o potencial antioxidante dos produtos naturais no geral (Gouvinhas *et al.*, 2014; Soufi *et al.*, 2014). Relativamente ao TOT existem estudos que comprovam uma correlação positiva entre este e o valor de TPT, comprovando portanto a ligação dos valores de TOT e TPT ao potencial antioxidante do extrato (Parpot, *et al.*, 2022). Esta correlação parece ser válida no caso do própolis do Gerês, tanto neste ano (conforme se irá abordar aquando da análise dos resultados do ensaio antioxidante do G23.EE) como em anos anteriores (Freitas *et al.*, 2022; Caetano *et al.*, 2023). Para além disso é possível também detetar valores de TOT superiores em extratos etanólicos quando comparados com extratos aquosos (Freitas *et al.*, 2024). Através de análises de amostras do mesmo local de anos anteriores

o valor de TOT do G23.EE encontra-se dentro dos demais valores, comprovando, novamente, a constância química dos extratos de própolis do Gerês (Caetano, *et al.*, 2023).

3.2. Potencial antioxidante do G23.EE

A análise da atividade antioxidante do G23.EE foi avaliada através de um ensaio de DPPH• (ensaio da atividade de eliminação de radicais livres) (Tabela 6).

***Tabela 6**: Atividade de eliminação de radicais livres por G23.EE. Os resultados foram expressos em EC_{50} (µg/mL) como média ± DP (n ≥ 3). O ácido gálico foi usado como padrão.*

Atividade de eliminação de radicais livres EC_{50} (µg/mL)	Ácido gálico	G23.EE
DPPH	1,21 ± 0,08	24,99 ± 1,40

De acordo com Sheng *et al.*, (2007) um produto ou composto natural pode ser classificado como possível antioxidante se exibir capacidades de eliminação de radicais DPPH. Estudos anteriores relataram, ainda, que o própolis português se apresentou, em inúmeras ocasiões, como um produto natural com essa capacidade (Moreira *et al.*, 2008; Freitas *et al.*, 2019; Paula *et al.*, 2023).

O resultado apresentado para o ensaio de DPPH, quando comparado com as análises de anos anteriores para amostras com a mesma origem geográfica encontra-se ligeiramente afastado do expectável (20,3 ± 0,3 para G13 e 21.49 ± 1.15 para G20, por exemplo) (Freitas *et al.*, 2019; Peixoto *et al.*, 2022; Caetano *et al.*, 2023). Apesar deste resultado poder indicar uma ação antioxidante inferior quando comparada com as análises anteriores, existe uma associação de elevados valores de TFT (Nichitoi *et al.*, 2021), TOT e TPT (Freitas *et al.*, 2022) a uma forte ação antioxidante, conforme citado anteriormente. Desta forma, os valores de TPT e TFT do G23.EE apontam para uma atividade antioxidante promissora. Mais, foram relatados valores de EC_{50} entre 10 e 30 µg/mL para extratos etanólicos de amostras de própolis de outras localidades em Portugal (Tomás, *et al.*, 2013).

3.3. Atividade antimicrobiana do G23.EE

A atividade antimicrobiana é uma das bioatividades mais documentadas e amplamente estudadas do própolis. Os valores de concentração mínima inibitória (MIC) do G23.EE foram determinados contra um conjunto de bactérias e leveduras previamente selecionadas e encontram-se apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: *Valores de MIC (µg/mL) do G23.EE contra o painel de microrganismos selecionados como indicadores de suscetibilidade. Para cada estirpe foram realizados 3 ensaios independentes com 3 réplicas cada um.*

	Estirpe	MIC (µg/mL)
Bactérias	Gram-positiva	
	Bacillus cereus	50
	Bacillus megaterium	*> 2000*
	Bacillus subtilis	50
	Propionibacterium acnes	500
	Staphylococcus aureus suscetível à meticilina (MSSA)	2000
	Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA)	*> 2000*
	Staphylococcus epidermidis	750
	Gram-negativa	
	Escherichia coli	*> 2000*
Leveduras	*Candida albicans*	*> 2000*
	Saccharomyces cerevisiae	*> 2000*

A análise dos resultados da atividade antimicrobiana é especialmente relevante por nos encontrarmos numa época em que a elevada resistência de microrganismos a antibióticos e antifúngicos se torna uma ameaça global (Region *et al.*, 2015; Brown & Wright, 2016; Khan, 2023). De facto, o estudo desta propriedade biológica pode levar à identificação de abordagens inovadoras para combater o desafio mundial da resistência antimicrobiana, quer pela utilização de extratos de própolis ou dos seus compostos e/ou pela sua combinação com outras abordagens cujos efeitos colaterais e eficácia não se assemelhem aos dos usados atualmente (Probst *et al.*, 2011; Oliveira, *et al.*, 2022).

A análise da Tabela 7 permite constatar a maior suscetibilidade das bactérias *Bacillus cereus* e *B. subtillis* ao extrato G23.EE por apresentarem os valores de MIC mais baixos (50 µg/mL), seguidas de *Propionibacterium acnes* e *S. epidermidis* (500 e 750 µg/mL, respetivamente). Especial destaque para a

suscetibilidade da *Staphylococcus epidermidis* por ser uma das estirpes de bactérias comumente associadas às infeções em lesões cutâneas (Young, 2012), sendo este resultado um forte indicador do uso promissor de G23.EE em estratégias terapêuticas para esta patologia.

De forma geral, tanto os resultados dos ensaios antimicrobianos do G23.EE como os de análises anteriores de extratos de própolis do Gerês ao longo dos anos indicam que as bactérias Gram-negativos são menos suscetíveis à ação do própolis quando comparadas com as bactérias Gram-positivos (**Tabela 7;** Freitas *et al.*, 2019; Peixoto *et al.*, 2022; Caetano, *et al.*, 2023). Este resultado é explicado pelas diferenças estruturais entre as paredes celulares bacterianas das bactérias Gram-positivo e Gram-negativo (Ramanauskienė *et al.*, 2013; Oryan *et al.*, 2018; El-Guendouz *et al.*, 2018**;** Bankova *et al.*, 2000).

Além de *E. coli,* MRSA também não se revelou suscetível a G23.EE. Contrariamente ao que aconteceu, por exemplo, no extrato G15 cujo valor de MIC contra ambas foi >1250 μg/mL (Peixoto *et al.*, 2022). Pelo contrário, todos os G.EEs já estudados no grupo exibem atividade contra todas as bactérias do género *Bacillus* testadas, com valores de MIC entre 50 e 100 μg/mL , excetuando o G23.EE, cujo valor de MIC para a *Bacillus megaterium* foi > 2000 μg/mL, ou seja, não reflete suscetibilidade ao extrato. Dado que esta atividade antimicrobiana tem sido congruentemente relatada ao longo de mais de duas décadas, podemos considerá-la um indicador da consistência das inúmeras amostras já analisadas, apontando que, possivelmente, a resistência observada neste ano de colheita seja apenas excecional e relacionada com algum dos vários parâmetros micro e/ou macrogeográficos citados anteriormente (Caetano, *et al.*, 2023). Por exemplo, estudos demonstraram que a atividade antimicrobiana de algumas amostras de própolis em relação a estirpes específicas parece ser dependente do ano de colheita (Pamplona-Zomenhan *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2020; Caetano *et al.*, 2023).

A comparação geral dos valores de MIC do G23.EE com os dos extratos dos últimos anos indica algumas irregularidades, mantendo-se os valores para *B. cereaus, B. subtillis, E.coli,* MRSA*, C. albicans e S. cerevisae* igual aos últimos 2 anos (Caetano, *et al.*, 2023). Destaque da suscetibilidade da *P. acnes* ao G23.EE (MIC 500 μg/mL), contrariamente, por exemplo, ao ano de 2013 em que a suscetibilidade era menor (Peixoto *et al.*, 2022). O valor de TFT avaliado anteriormente, que é o mais baixo desde há 4 anos, pode também justificar as irregularidades nos valores relativos à suscetibilidade dos outros microrganismos testados, já que o conteúdo de flavonóides de um composto natural está diretamente relacionado com a sua capacidade antimicrobiana (Silva *et al.*, 2006; Kalogeropoulos *et al.*, 2009; Bonvehí & Gutiérrez, 2012).

Por fim, relativamente à inibição do crescimento de leveduras, G23.EE não mostrou atividade inibitória; de facto, apenas os G15.EE, G19.EE, G21.EE e G22.EE, apresentaram atividade antifúngica. O primeiro

contra ambas as leveduras (MIC > 1500 μg/ mL contra *S. cerevisae* e MIC 1000 μg/ mL contra *C. albicans*) (Peixoto *et al.*, 2022), o segundo contra *C. albicans* (MIC 1500 μg/ mL) e o terceiro e quarto contra ambas as leveduras (MIC 2000 μg/ mL contra *S. cerevisae* e *C. albicans)* (Caetano, *et al.*, 2023). É, no entanto, um resultado díspar ao observado para o mesmo tipo de própolis (própolis de choupo) de diferentes regiões europeias, como é o caso de extratos búlgaros, gregos ou turcos que apresentaram, respetivamente halos de inibição com diâmetro em mm de 13 ± 1, 12 e 21,7 ± 0,6 contra *C. albicans* (Velikova *et al.*, 2000). Adicionalmente, Bonvehí & Gutiérrez, (2012) relatou ainda a suscetibilidade de *S. cerevisae* e *C. albicans* contra extratos de própolis espanhóis com halos de inibição que apresentaram de 4 a 10 mm de diâmetro.

4. Impressão 3D dos filmes poliméricos

4.1. Otimização e impressão das formulações

Para que seja possível a impressão 3D da formulação apropriada é necessário um processo de otimização das bio tintas com o intuito de atingir as características específicas que se encaixem em DIW, na técnica de MEX, bem como na aplicação do produto final. Nesta fase, foram também testados 2 substratos de impressão distintos: vidro e PS, tendo-se concluído que o segundo permitiu uma extração consideravelmente mais facilitada dos filmes sem danificar a sua estrutura, contrariamente ao vidro.

O processo de otimização da bio tinta para impressão iniciou-se testando a impressão de 5 misturas distintas de Ch com AA (0,5%) cujas concentrações foram 2%, 2,5%, 3%, 3,5% e 4%. Através do teste de impressão das diferentes formulações apenas as misturas correspondentes às concentrações 2,5%, 3% e 3,5% conseguiram ser impressas. Verificou-se que a formulação polimérica de 2% apresentava um nível de viscosidade demasiado baixo, impedindo a possibilidade da manutenção da *shape fidelity* (capacidade de manutenção da forma desenvolvida no *software* de impressão 3D por parte da bio tinta mesmo após deposição no substrato). Por sua vez, a formulação polimérica de 4% revelou-se excessivamente viscosa, impedindo a sua extrusão através da seringa.

Depois de percecionar quais as concentrações poliméricas com o qual era possível a impressão 3D foi iniciada a incorporação do G23.EE na formulação de Ch/AA, para isso foram testadas 4 concentrações distintas do extrato, (0,08 g/mL, 0,16 g/ml, 0,30 g/mL e 0,50 g/mL), que eram adicionadas à formulação de Ch em diferentes volumes (desde 0,5% a 12,5%) sendo estas inicialmente adicionadas à mistura polimérica em agitação magnética, gota a gota. Esta forma de inserção do extrato na formulação originou uma bio tinta com aglomerados, impedindo a obtenção de uma formulação homogénea. Apesar da sua

heterogeneidade as formulações foram processadas e encontram-se na Figura 30 dois exemplares dos filmes obtidos onde estão assinalados por setas os aglomerados correspondentes à cristalização de própolis.

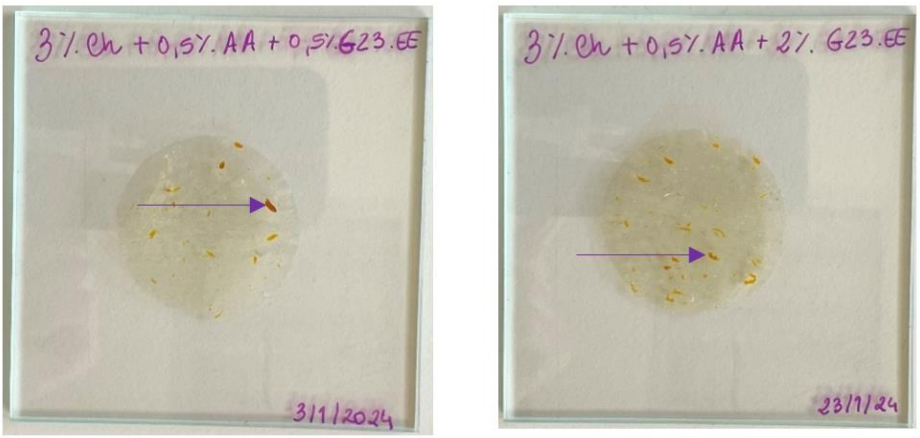


Figura 30: *Filmes impressos através da adição de G23.EE gota a gota em agitação magnética cujos aglomerados de própolis cristalizados se encontram devidamente identificados com setas*

Com o intuito de evitar a formação de aglomerados de própolis pela estratégia de incorporação do extrato na formulação, o processo foi alterado iniciando-se pela preparação de uma mistura de G23.EE com AA (0,5%) e sua posterior homogeneização em banho de ultrassons durante 30 minutos.

Através da sonicação foram obtidas soluções líquidas de G23.EE e AA com diferentes concentrações de extrato (0,08 g/mL, 0,16 g/ml, 0,30 g/mL e 0,50 g/mL). Esta estratégia de processamento resultou numa melhoria considerável na homogeneização do solvente com o extrato, apesar de ser notória alguma acumulação de própolis solidificado no frasco de vidro em que as soluções foram sonicadas. Mais, a acumulação aumentou gradualmente com o aumento de concentração do extrato, conforme evidenciado na Figura 31, que compara as misturas de 5% de G23.EE (nas concentrações 0,08 g/mL (A); 0,16 g/mL (B) e 0,50 g/mL (C)) com AA (0,5%) após sonicação.

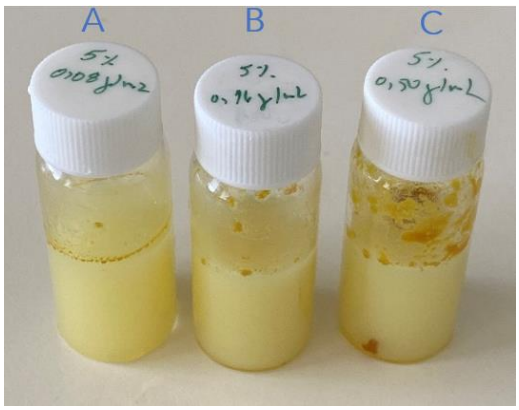


Figura 31: *Soluções de 5% de G23.EE (nas concentrações 0,08 g/mL (A); 0,16 g/mL (B) e 0,50 g/mL (C)) com AA (0,5%) após banho de ultrassons.*

Após sonicação da mistura, seguiu-se a incorporação gradual do Ch em pó nesta solução sob agitação magnética, num gobelé de vidro, à temperatura ambiente (25 °C), mantendo-a sob agitação durante, pelo menos, 1 h.

Nesta fase, foi testada a adição das 3 concentrações poliméricas conforme descrito anteriormente: 2,5%, 3% e 3,5%. O teste destas 3 concentrações de Ch permitiu aferir que a concentração onde eram alcançados 12,5% de G23.EE mesmo na máxima concentração de extrato (0,50 g/mL) foi 3% Ch, resultando numa bio tinta final sem aglomerados de extrato ou poliméricos, com cor, textura e aparência uniforme e, ainda, capaz de ser impressa sem alterar a viscosidade e, consequentemente, mantendo a sua *shape fidelity*. A impressão de filmes com o processamento da bio tinta para impressão conforme ditado encontra-se representada na Figura 32.

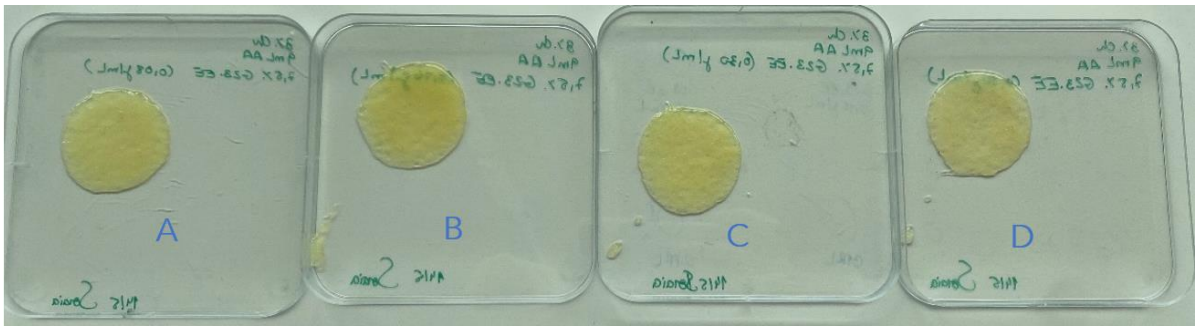


Figura 32: *Impressão de filmes com 3% Ch, 0.5% AA e 7.5% G23.EE (A: 0,08g mL; **B**: 0,16 g/mL; **C**: 0,30 g/mL e **D**: 0,50 g/mL)*

Apesar de não serem visíveis a olho nu diferenças significativas relativamente ao aspeto das amostras impressas com concentrações e volumes distintos de G23.EE (Figura 32) após o processo de secagem já é observável uma diferenciação entre filmes, principalmente na sua cor.

Após impressão dos filmes poliméricos passa-se à extração do solvente, AA, para posterior extração do filme do substrato. Desta forma, durante o processo de otimização da bio tinta, impressão e caracterização foram testadas duas metodologias para extração do solvente. Inicialmente foi testada a extração do solvente num ambiente com temperatura controlada (25 °C), sem luz e protegendo devidamente as impressões de forma que não fossem tocadas até à sua secagem por completo. Apesar de ser um processo demorado, aproximadamente 24 h, ou superior dependendo da concentração de G23.EE, a extração de solvente por *solvent casting* demonstrou ser um método que mantém a integridade do filme impresso, sem alterar a sua *shape fidelity*. Permite ainda a cristalização do polímero e solidificação do própolis de forma homogénea em ambas as superfícies e não cria dificuldade na remoção do material do substrato. Existem, inclusive, estudos que defendem esta metodologia de extração do solvente em filmes pela possibilidade de

recuperação do próprio solvente e sua posterior utilização, pelo baixo custo do método, bem como pela simplicidade de protocolo geral a este associada (Siemann, 2005). Adicionalmente, esta forma de extração do solvente tem vindo a ser usada em diversos materiais impressos em 3D com várias aplicações, incluindo para materiais com aplicações biomédicas como reparação cutânea onde é destacado pelo seu uso frequente (Savencu *et al.*, 2021; Jorbolla-Jiménez *et al.*, 2023).

A segunda metodologia de extração de solvente dos filmes testada foi a liofilização, este processo promoveu um aumento da espessura do filme. A liofilização é amplamente reconhecida pela sua elevada capacidade de extração de solventes quase na sua totalidade, bem como pela capacidade de aumentar a porosidade intermolecular de alguns materiais (Snowman, 1997; Gaidhani *et al.*, 2015; Bhosale *et al.*, 2021). No entanto, tanto pela necessidade da preparação prévia das amostras a liofilizar (congelamento por, pelo menos 24 h) como pela possibilidade da alteração da estrutura interna das amostras ou perda das suas capacidades, pode não ser a metodologia de extração de solvente mais indicada, principalmente se as amostras forem incorporadas com algum composto natural cuja estabilidade pode ser modificada dependendo das ligações estabelecidas (Kasper *et al.*, 2013; Jadhav & Moon, 2015). Desta forma, após análise e teste das amostras liofilizadas foi constatada a inexistência de qualquer atividade antimicrobiana, descartando a utilização desta metodologia de extração de solvente.

Após otimização do processo da formulação de bio tinta, impressão e extração do solvente foram impressas várias amostras cuja única variável foi a concentração de G23.EE, tendo todas por base 3% de Ch + 0,5% AA. Relativamente ao G23.EE foram impressas as concentrações: 2,5%, 5%, 7,5%, 10% e 12,5%, cada uma destas tendo sido testada em 4 soluções com concentração distinta (0,08 g/mL, 0,16 g/mL, 0,30 g/mL e 0,50 g/mL). Após impressão das formulações referidas foram então selecionadas as concentrações 2,5%, 7,5% e 10% de G23.EE (preparadas com a solução 0,50 g/mL, conforme representado na Figura 33) para entre si em relação às outras e cujos valores se integravam nos materiais já estudados em literatura (Savencu *et al.*, 2021; Borbolla-Jiménez *et al.*, 2023).



Figura 33: *Filmes obtidos por DIW de quitosano (3%), AA (0,5%) e G23.EE (**A**: 2,5%) (**B**:7,5%) (**C**: 10%)*

Na Figura 33 encontra-se visível a alteração de tonalidade nos filmes impressos, que é proporcional com o aumento da concentração de extrato na sua formulação, em que A apresenta apenas 2,5% de G23.EE (0,50 g/mL), B apresenta 7,5% (0,50 g/mL) e C apresenta 10% (0,50 g/mL), a máxima concentração.

5. Microscopia eletrónica de varrimento

A morfologia superficial e em secção de corte dos filmes impressos foi analisada recorrendo à análise SEM e as imagens obtidas encontram-se representadas abaixo na Figura 34.

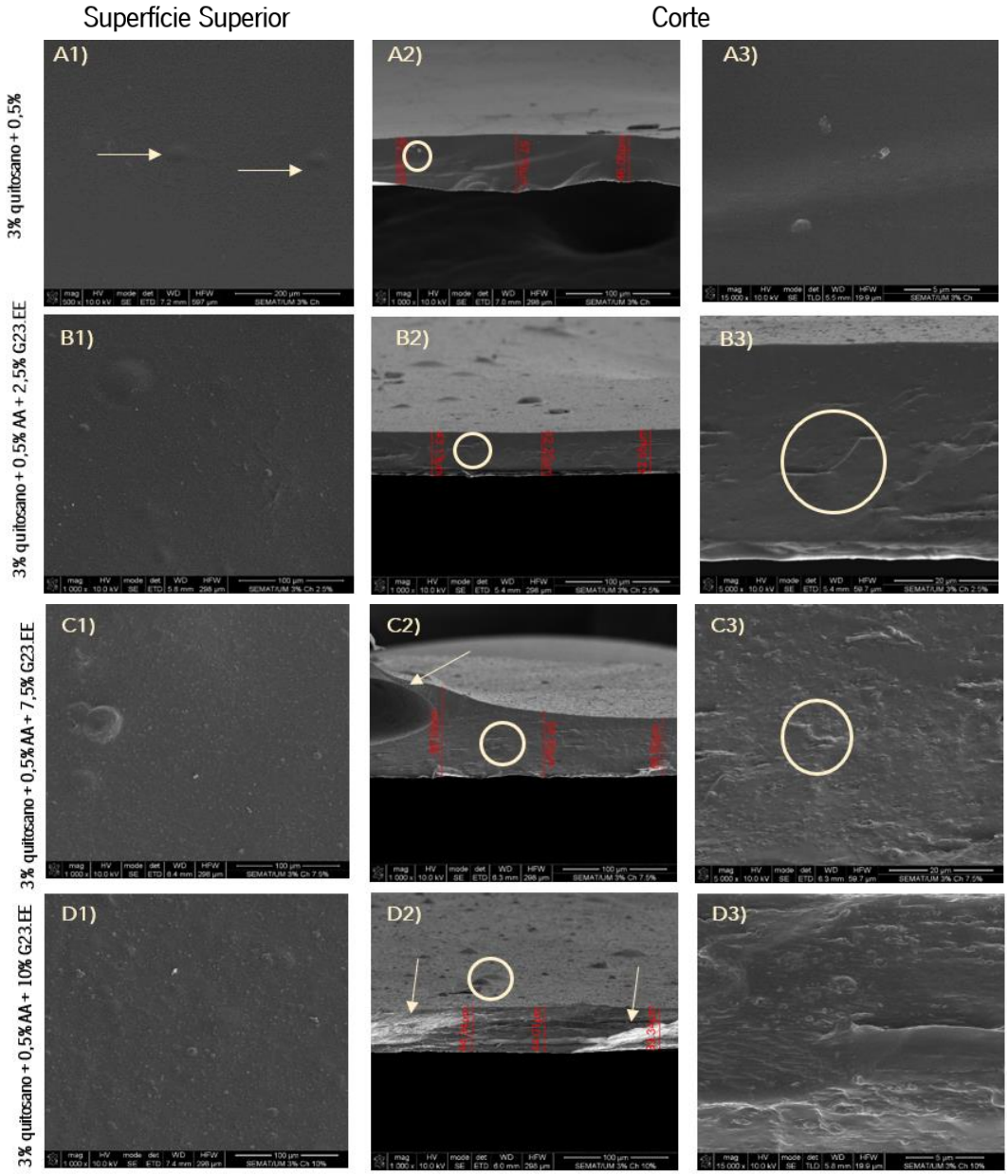


Figura 34: *Imagens SEM do filme sem G23.EE: **A1**) Superfície superior, **A2**) e **A3**) Corte; Filme com 3% Ch, 0,5% AA e 2,5% G23.EE: **B1**) Superfície superior, **B2**) **B3**) Corte; Filme com 3% Ch, 0,5% AA e 7,5% G23.EE: **C1**) Superfície superior, **C2**) **C3**) Corte; Filme com 3% Ch, 0,5% AA e 10% G23.EE: **D1**) Superfície superior, **D2**) **D3**) Corte. Todas as imagens com a numeração 2 apresentam uma secção rodeada que se encontra ampliada nas imagens com a numeração 3.*

Através da análise das imagens de SEM podemos detetar que, no filme puro de Ch (Figura 34; A1 A2 e A3) é possível verificar que este material não apresenta poros. É um filme com uma estrutura homogénea, com reduzida irregularidade (representadas por setas em A1)) que se acredita, conforme mencionado na literatura, serem devido ao aparecimento de bolhas de ar aquando do processo de homogeneização/impressão da biotinta, bem como pela própria viscosidade que lhe é característica (Germini & Peltonen, 2021). Relativamente à microestrutura do filme em secção de corte (A2 e A3) apresenta também elevada homogeneidade e ausência de poros, comprovada pela manutenção da espessura do material.

A espessura de todos os filmes representados na Figura 34 foi obtida através do *software Image J* (Java 8) e o valor médio para cada amostra analisada foi calculado tendo em conta 3 medições em locais distintos do corte da amostra. Relativamente à espessura da amostra pura o valor da média foi 49,82 μm, o segundo mais elevado de todos.

Em B1, B2 e B3 da Figura 34 encontra-se representado o filme com 3% Ch + 0,5% AA + 2,5% G23.EE. É possível distinguir um material com características semelhantes ao filme puro, com poucas irregularidades, ainda que consideravelmente mais irregular que o anterior e, também, sem poros. A literatura indica que a integração de extrato de própolis numa formulação polimérica de Ch poderá consolidar as interações moleculares em cadeia através de ligações estabelecidas entre grupos hidroxilo e amina do polímero e os grupos funcionais de polifenóis do própolis, característica esta que aumenta o seu grau de interação e coesão intermolecular (Ojagh *et al.*, 2010). Em B2 e B3 encontra-se também representada a homogeneidade de espessura do filme, cujo valor médio é 42,64 μm, inferior à anterior. Esta diminuição na espessura do filme é convergente com o estabelecimento de ligações entre o polímero e o própolis que aumentam o grau de coesão intermolecular do material. A ampliação de uma das zonas onde estão representadas irregularidades de cristalização encontra-se em B3.

No filme com 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE, representado nas imagens C1, C2 e C3, é visível o aumento nas irregularidades na superfície do material, bem como o aparecimento de fibras de quitosano, (C2), que podem ser dever-se à existência de impurezas (representadas por um círculo em C3) no polímero não homogeneizadas. Conforme demonstrado até então, mantém-se a inexistência de poros e aspeto geral do material. No entanto, nesta amostra em específico, o corte e sua análise foram feitos num local com uma bolha de tamanho considerável, representada por uma seta (C2). Esta irregularidade acabou por se refletir num valor de espessura significativamente superior, com valor médio de 70,80 μm, alterando a

característica que se mantém em todas os outros filmes, a homogeneidade da espessura. No entanto, por se tratar de uma anomalia apresentada unicamente nesta amostra considera-se uma exceção.

Com relação ao filme com 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE, representado em **D1**, **D2** e **D3**, mantém-se o aumento gradual das irregularidades na superfície superior, que se encontram particularmente evidenciadas na imagem **D2**. Relativamente à homogeneidade da espessura, cujo valor médio é 42,56 μm, ao longo do corte transversal é evidenciada uma diferença entre 1 das medições. Esta diferença pode ser devido a uma inconstância presente nesta mesma secção de corte, comprovada nas imagens **D2** e **D3** em que existem secções, representadas por setas (em **D2**), com zonas brancas. Esta é uma consequência da acumulação de cargas em zonas de maior profundidade no corte transversal (Wang *et al.*, 2022) que não foi feito de igual forma em todas as zonas, contrariamente às imagens das demais amostras.

Através da comparação das imagens do filme puro com os filmes contendo G23.EE conseguimos detetar um aumento gradual das irregularidades da superfície dos filmes que se revelou proporcional ao aumento no volume de G23.EE. A inexistência de poros foi característica que se manteve presente em todos os filmes analisados, independentemente da concentração de G23.EE, bem como a espessura, que excetuando nas irregularidades expostas acima, se manteve com valores médios relativamente constantes e indicando, ainda, uma diminuição ,deste aspeto, proporcional com a incorporação do G23.EE quando comparado com o valor da amostra pura de Ch. Esta característica, conforme explicado anteriormente, pode ser relatada pelo aumento da coesão intermolecular dos filmes de Ch aquando da incorporação de própolis cujas ligações auxiliam a compactação do material (Ojagh *et al.*, 2010; Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016).

6. Espetroscopia de Infravermelhos em Modo de Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR)

Com o intuito de estudar se a incorporação de própolis na matriz polimérica induziu mudanças ao nível da estrutura química, os filmes de Ch puro e com própolis incorporado (3% Ch + 0.5% AA + 2,5%; 7,5% e 10% G23.EE) bem como amostras de G23.EE liofilizado e a amostra bruta de própolis G23 foram analisados através de um ensaio de ATR-FTIR cujos espetros obtidos se encontram apresentados na Figura 35.

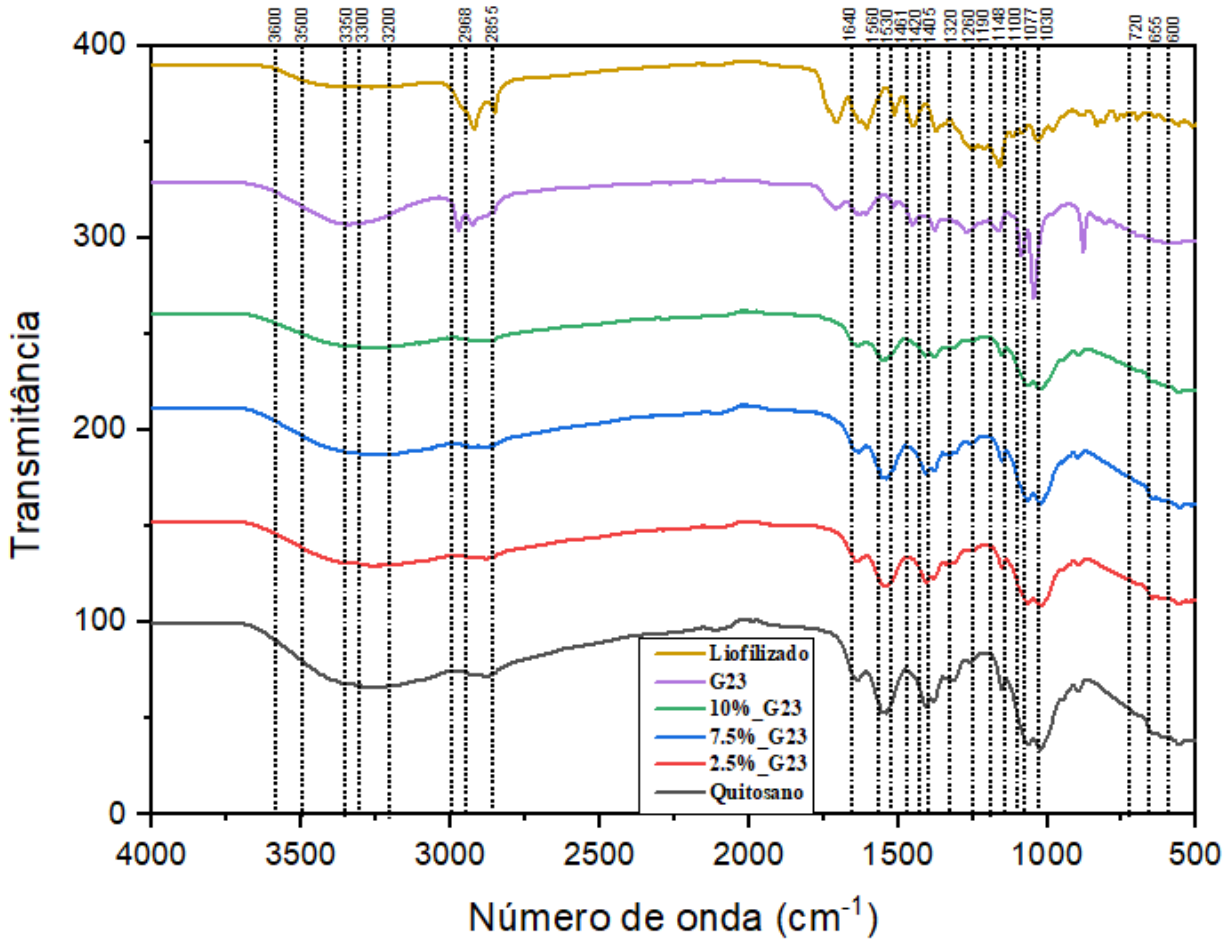


Figura 35: *Espetro de FTIR-ATR das amostras de G23.EE liofilizado, amostra bruta G23, filme com 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE; filme com 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; filme com 3% Ch + 0,5% AA + 2,5% G23.EE e filme com 3% Ch + 0,5% AA, respetivamente de cima para baixo.*

Através da análise dos espetros de ATR-FTIR apresentados destaca-se, nos dois primeiros (Figura 35), a presença da banda entre os 3350 e 3300 cm^{-1} observada em amostras de própolis que ocorre devido à vibração de alongamento O-H do grupo de compostos fenólicos. Relativamente a estes mesmos grupos são destacáveis também vibrações de alongamento C-O observadas na faixa espectral entre 1405 e 1220 cm^{-1} e sob a forma de uma série de vibrações entre os 1260 e 1190 cm^{-1}. Os fenóis encontram-se também representados pelo alongamento de um anel aromático C=C em 1640 cm^{-1} e uma vibração de deformação aromática C-H em 1110 cm^{-1} (Socrates, 2004; Zin *et al.*, 2019; Svečnjak *et al.*, 2020). Por sua vez, a

presença de uma banda de transmissão entre 600 e 720 cm^{-1} representa o pico de balanço de CH_2 de hidrocarbonetos derivados da cera de abelha (Svečnjak *et al.*, 2020).

Com relação à presença de compostos flavonóides destaca-se a banda entre os 1530 e 1500 cm^{-1} pelo alongamento C=C (anel aromático) (Moț *et al.*, 2011). Também devido à presença de compostos flavonóides distinguem-se as deformações C-H e o alongamento aromático em 1461 cm^{-1} pelas vibrações dos hidrocarbonetos CH_3 e CH_2, que se sobrepõem neste pico. Especial atenção para a banda larga mais proeminente, que surge mais aparente no espetro relativo à amostra G23, relativa à vibração de alongamento assimétrico C-O de ésteres de ácidos alifáticos (com átomos de carbono em cadeias abertas ou cíclicas, não aromáticos) observado em 1170 cm^{-1} (Socrates, 2004; Zin *et al.*, 2019). Ademais, é visível uma banda no espetro das duas primeiras amostras entre 3200 e 3500 cm^{-1} relativa às vibrações de alongamento das interações intermoleculares de ligações de hidrogénio (O-H), bem como picos entre 2855 e 2968 cm^{-1} que caracteriza a presença de alongamentos simétricos e assimétricos de grupos metil e metileno (CH_3 e CH_2), presentes também em inúmeras amostras de própolis conforme apresentado na literatura (Zin *et al.*, 2019; Svečnjak *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2020).

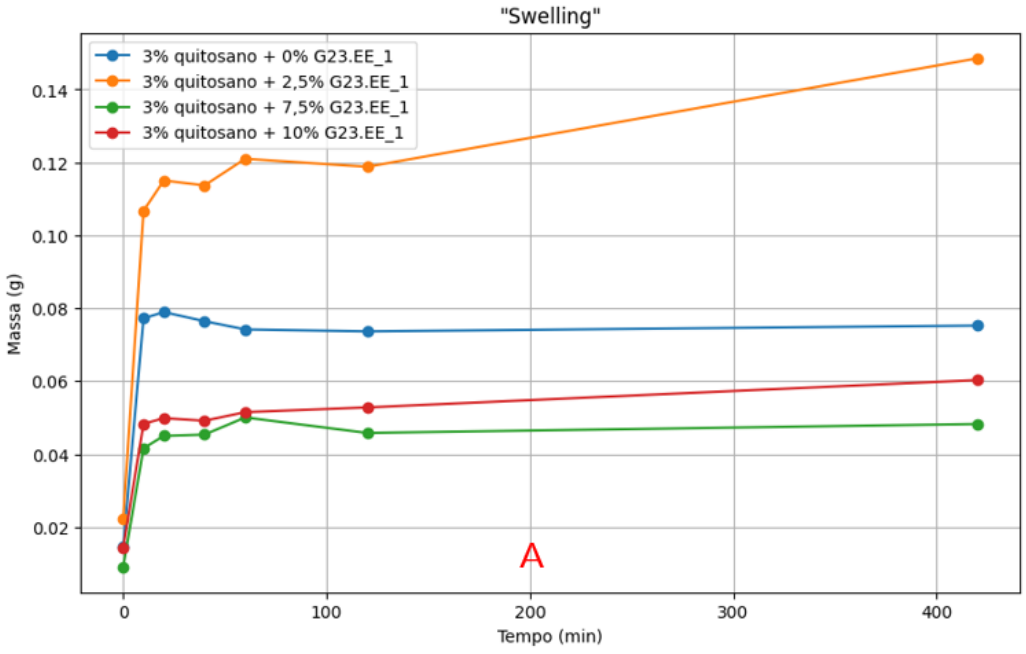
No que consta à análise dos espetros de ATR-FTIR relativos ao própolis, tanto liofilizado como no estado bruto, podemos afirmar que a complexidade dos espetros é altamente específica, assemelhando-se aos dados encontrados na literatura de análises químicas de outros própolis de choupo, onde o G23 se encaixa (Oliveira *et al.*, 2016; Vahur *et al.*, 2016; Zin *et al.*, 2019; Ahmed *et al.*, 2020; Dezmirean *et al.*, 2020; Svečnjak *et al.*, 2020).

Relativamente ao polímero Ch, de forma geral, destacam-se as mesmas bandas e picos de absorção que as encontradas em literatura em amostras de Ch com AA como solvente (Osman & Arof, 2003; Mauricio-Sánchez *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021). Através da análise do último espetro de ATR-FTIR (**Figura 35**), relativo ao filme de Ch puro, podemos destacar a banda/"barriga" entre 3600 e 3000 cm^{-1} correspondente ao alongamento das ligações de hidrogénio (O-H) no grupo hidroxilo (Kumar-Krishnan *et al.*, 2014). A presença da banda de absorção em 655 cm^{-1} caracteriza a presença de grupos OCO do solvente (Mauricio-Sánchez *et al.*, 2018). Por sua vez, os grupos CH_n encontram-se representados pela banda entre os 1320 e 1420 cm^{-1} (Becerra *et al.*, 2017; Mauricio-Sánchez *et al.*, 2018). Por fim, os picos em 1148, 1077 e 1030 cm^{-1} correspondem também ao alongamento característico da ligação C-O-C do polímero (Yuan *et al.*, 2010). Todos os picos referidos e, na generalidade, todo o espetro relativo à análise do filme de Ch puro encontra-se de acordo com as referências estudadas em literatura (Yuan *et al.*, 2010; Mauricio-Sánchez *et al.*, 2018; Qiao *et al.*, 2021).

A inserção da análise da amostra de G23 no estado bruto entre os vários filmes teve como principais objetivos entender se a sua incorporação no polímero seria capaz de alterar a sua estrutura química, bem como a possibilidade de alteração a nível químico da amostra bruta de própolis após extração. A aferição destas possibilidades é de extrema importância dado que, sem a manutenção da estrutura química tanto do própolis como do polímero seria inviável a impressão de um material com as propriedades pretendidas. Realça-se a elevada compatibilidade do polímero com o composto natural, que resulta na presença de ligações de elevada afinidade, aumentando consequentemente a coesão intermolecular do filme como produto final (Ojagh *et al.*, 2010). Desta forma é expectável o resultado dos espetros de ATR-FTIR apresentados, em que a comparação das amostras de G23 quando incorporadas na formulação de 3% Ch + 0,5% AA não refletem a presença de nenhum pico ou banda novo, apenas se complementam. Por sua vez, a análise de G23.EE liofilizado foi feita com o propósito de percecionar se a liofilização do própolis após extração refletia a presença de algum composto que até então estaria ausente. Tal suposição não se confirmou, tendo-se adicionalmente conferido a presença de bandas/ picos característicos mais proeminentes deste composto natural no espetro de amostra bruta G23 que não surgiram na amostra de G23.EE liofilizada (*e.g.,* 1170 cm^{-1}).

7. Ensaio de inchamento

De forma a estudar o comportamento dos filmes em contacto com meio líquido procedeu-se a um ensaio de *swelling* estimando o ganho de massa do material ao longo do tempo com um máximo de 21 dias, no ensaio com dH_2O e 24 h no ensaio com PBS 1% (*v/v*). Os resultados de ambos os ensaios encontram-se representados nas Figuras 36 e 37.



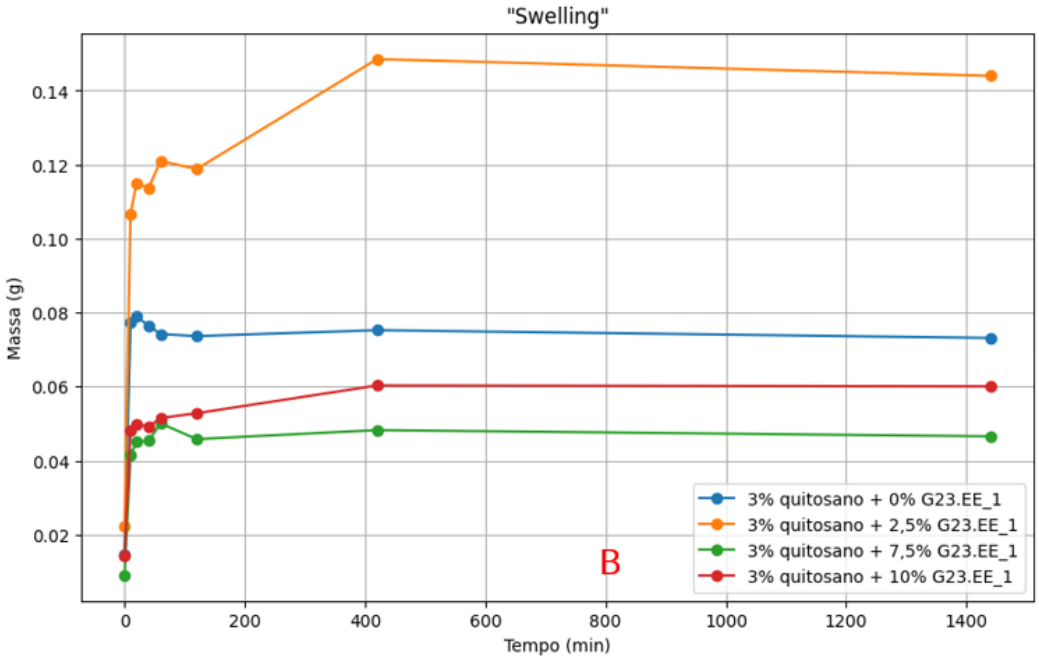
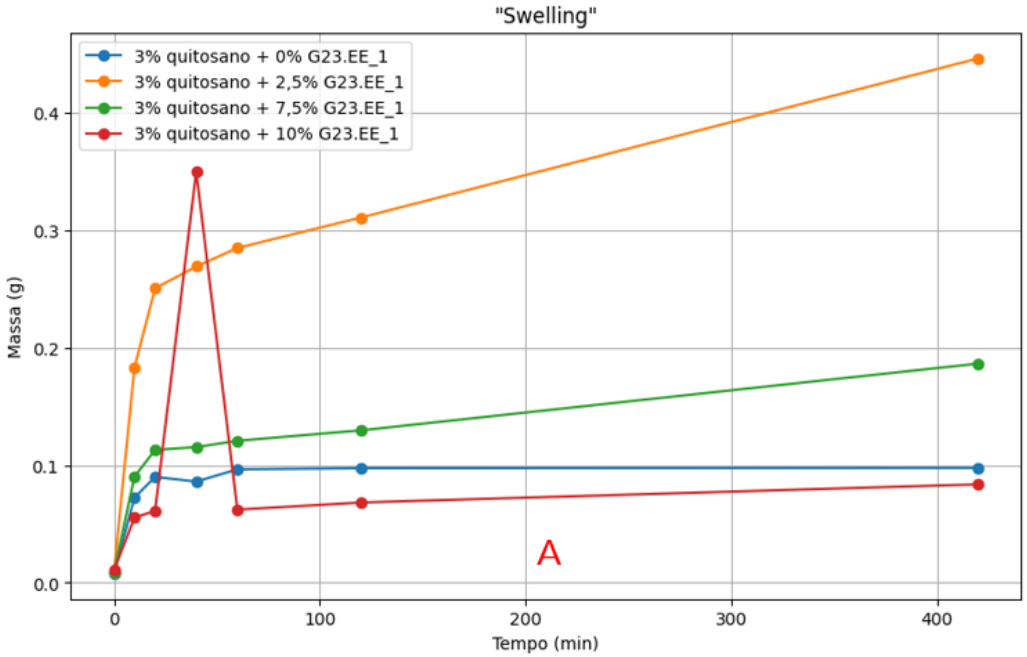


***Figura 36**: Representação gráfica das pesagens do ensaio de swelling com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de PBS 1% (v/v). **A**) pesagens do ensaio até as 7h **B**) pesagens do ensaio completo durante as 24h*



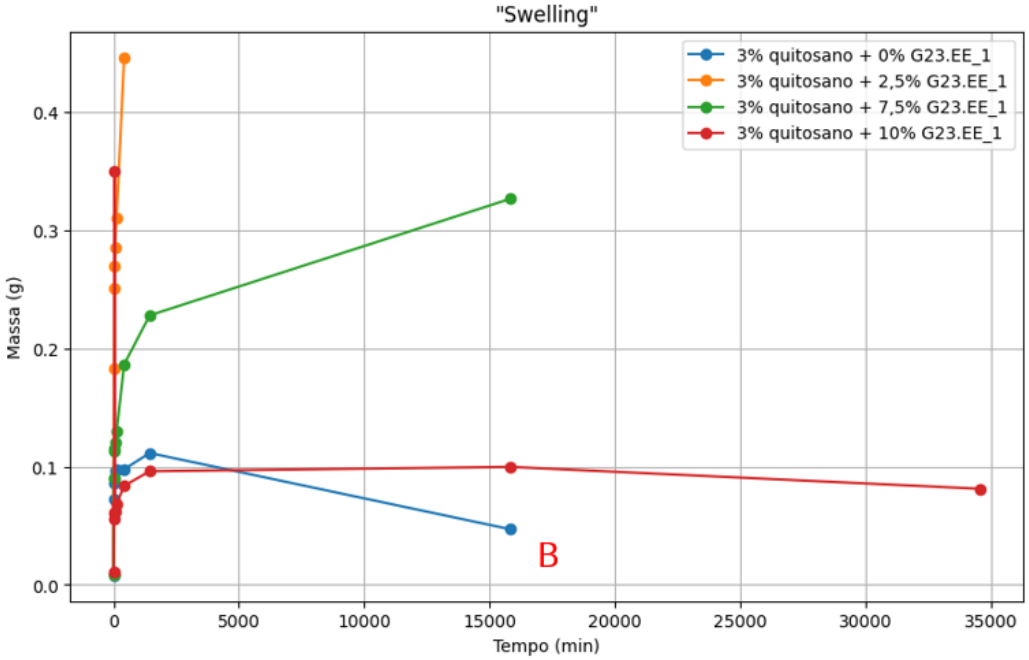


Figura 37: *Representação gráfica das pesagens do ensaio de swelling com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de dH2O.* ***A****) pesagens do ensaio até as 7h* ***B****) pesagens durante os 21 dias de ensaio*

Com o intuito de analisar a percentagem de *swelling* das amostras testadas em cada um dos meios líquidos os dados de pesagem dos filmes foram analisados e organizados na Tabela 8 de forma a quantificar a alteração de massa ao longo do tempo.

Tabela 8*: Representação do cálculo da percentagem de swelling, ganho de massa das amostras após 24h (PBS 1% v/v) e 21 dias (dH₂O).*

% inchamento	3% quitosano + 0,5% AA	3% quitosano + 0,5% AA + 2,5% G23.EE	3% quitosano + 0,5% AA + 7,5% G23.EE	3% quitosano + 0,5% AA + 10% G23.EE
PBS 1% (v/v)	427,03%	573,43%	422,73%	292,36%
dH_2O	487,65%	393,92%	3528,23%	753,64%

Antes e durante o decorrer do ensaio de *swelling* nos dois meios líquidos as amostras foram fotografadas aquando de todas as suas pesagem de forma que fossem relatadas tanto as modificações de massa como de cor, tamanho, forma e manutenção da integridade de cada uma. Nas Figuras 38 (ensaio com PBS) e 39 (ensaio com dH_2O) estão representadas as fotografias obtidas, devidamente legendadas e identificadas.

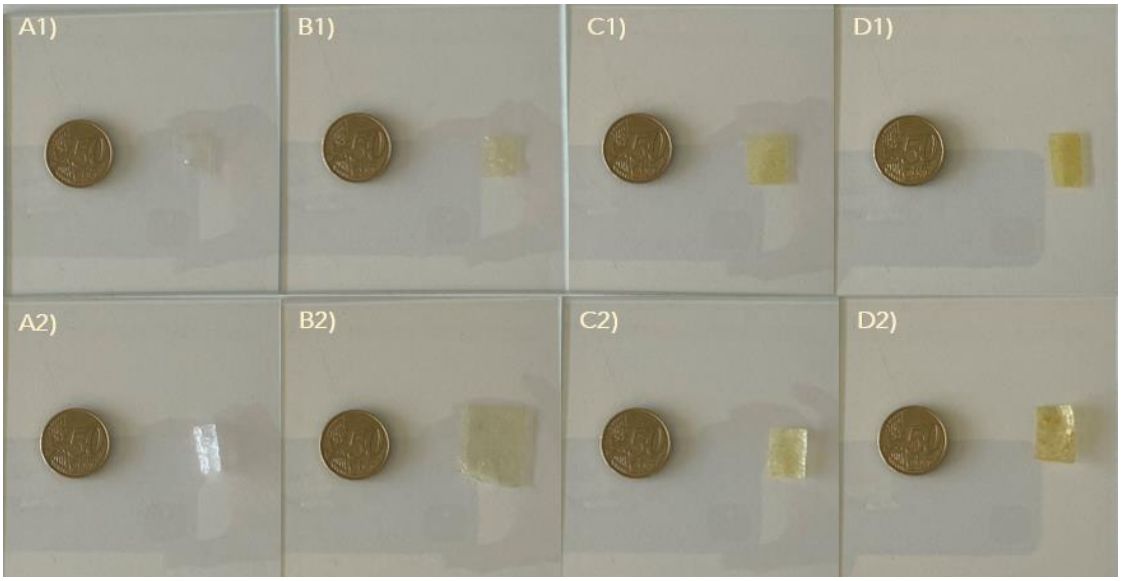


Figura 38: *Comparação das amostras antes do ensaio:* ***A1****) Ch puro;* ***B1****) 3% Ch + 0,5% AA + 2,5% G23.EE;* ***C1****) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE;* ***D1****) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE com as amostras ao fim de 24h de ensaio em contacto com o meio PBS 1% (v/v):* ***A2****) Ch puro;* ***B2****) 3% Ch + 0,5% AA + 2,5% G23.EE;* ***C2****) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE;* ***D2****) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE*

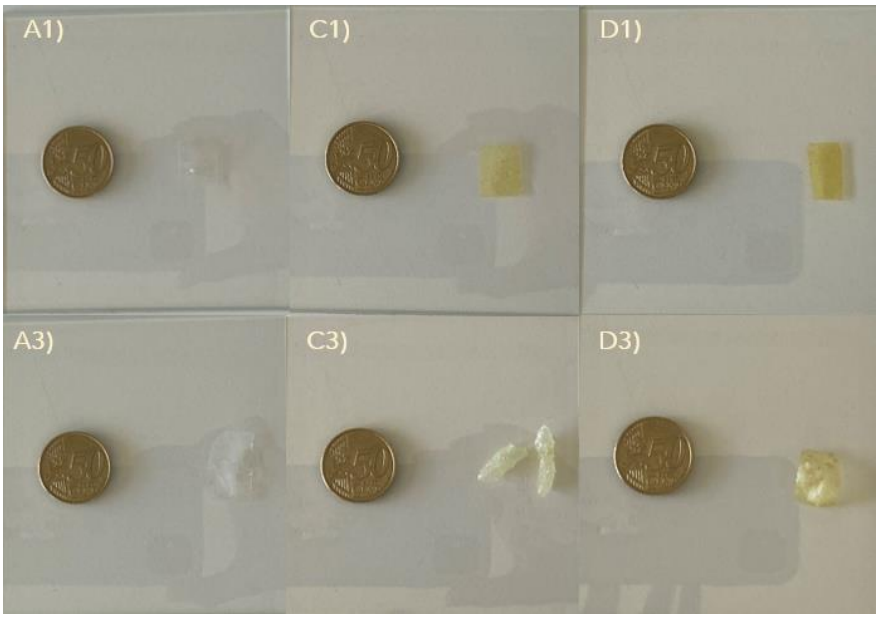


Figura 39: *Comparação das amostras antes do ensaio:* ***A1****) Ch puro;* ***C1****) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE;* ***D1****) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE com as amostras ao fim do ensaio em contacto com* dH_2O*:* ***A3****) Ch puro;* ***C3****) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE;* ***D3****) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE*

Através da análise das Figuras 36, 38 e Tabela 8, relativas ao ensaio de *swelling* em meio líquido PBS 1% (*v/v*) podemos afirmar que os filmes apresentaram, na generalidade, um comportamento de *swelling* intenso nos primeiros 10/20 minutos de imersão em solução. Especial destaque para o filme de com 2,5% G23.EE que apresentou maior percentagem de *swelling* (Figura 38 B1 e B2). Este comportamento resultou num ganho significativo de massa durante os primeiros 40 minutos ao qual se seguiu um período com alteração de massa inferior até às 2/2:30 h. Na seguinte pesagem todas as amostras apresentaram um novo, e último, ganho de massa. A amostra de Ch puro apresentou o menor valor até ao fim do ensaio, seguida da amostra com 7,5% G23.EE, 10% G23.EE e 2,5% G23.EE, respetivamente. Após as 24 h de ensaio nenhuma das amostras verificou qualquer alteração no seu valor de massa, dando-se o ensaio como terminado. Neste ensaio todas as amostras mantiveram a sua integridade e forma durante as 24 h, permitindo que, apenas as alterações de massa ditassem o seu fim, no entanto, em algumas amostras (Figura 38 C2 e D2) foi observada uma ligeira alteração da cor.

Relativamente ao ensaio realizado em dH_2O, através da análise dos resultados da Tabela 8 e Figuras 37 e 39 conseguimos confirmar também, na sua generalidade, um aumento proporcional de comportamento de *swelling* nas amostras com a incorporação de G23.EE. Durante as primeiras 24 h do ensaio, com a exceção da amostra com 2,5% G23.EE, todas as amostras aumentaram gradualmente o seu ganho de massa. Mais, a análise dos resultados estabelece uma correlação positiva, visível apenas no ensaio com dH_2O, entre o aumento gradual de comportamento de *swelling* dos filmes e o aumento da

concentração de G23.EE incorporado. Destaque para a amostra com 7,5% G23.EE, que apresentou maior percentagem de *swelling* de todos os ensaios (Figura 39, C3).

No que concerne à alteração de cor, tamanho e forma das amostras ao longo do ensaio, estas alterações foram mais visíveis, principalmente na forma das amostras, dificultando o processo de pesagem por se revelarem mais frágeis ao longo do tempo. Relativamente à manutenção da integridade das amostras durante o ensaio com dH_2O, o filme com 2,5% G23.EE apenas se manteve íntegro durante 7 h, justificando a anomalia presente nos resultados em que esta é a única amostra com valor de *swelling* inferior à amostra sem G23.EE. Apesar do ensaio se ter prolongado até aos 21 dias apenas a amostra de com 10% G23.EE manteve integridade suficiente para que o ensaio perdurasse. Por sua vez, amostras de Ch puro e com 7,5% G23.EE mantiveram a sua integridade durante 11 dias.

Apesar da dificuldade na manutenção da integridade das amostras em dH_2O, todas as amostras com G23.EE demonstraram um intenso aumento de massa ao longo do tempo, considerando-se superior ao obtido no ensaio com PBS. Isto é explicado pela afinidade hidrofílica do própolis e do quitosano com água. Materiais incorporados com própolis indicam que este composto natural tem a capacidade de aumentar a retenção de meio líquido, principalmente em dH_2O (Sato *et al.*, 2020), dado que se verifica através da comparação dos resultados de ambos os ensaios. Ademais, as ligações formadas entre o polímero e o própolis, conforme referido anteriormente, são características de materiais com aumento do comportamento de *swelling* e melhoria nas suas capacidades de adesão (Ramasamy & Shanmugam, 2015; Corrêa *et al.*, 2020).

O polímero utilizado é um polissacarídeo hidrofílico compostos por 3 grupos (grupo hidroxilo, amina e aldeído) que promovem locais que favorecem a absorção de água, sendo os materiais compostos por este polímero caracterizados por elevadas percentagens de *swelling* em dH_2O (Rodríguez-Núñez *et al.*, 2014; Ramasamy & Shanmugam, 2015; Sato *et al.*, 2020). Ensaios de *swelling* de filmes de Ch realizados em PBS também demonstram uma percentagem de *swelling* consideravelmente elevada, conforme confirmado através da comparação dos valores da amostra de Ch pura em que, nos dois meios não existe grande variabilidade (Campos *et al.*, 2009).

Desta forma, conclui-se através da comparação e análise dos resultados apresentados que, no que concerne o polímero e própolis utilizados o comportamento das amostras nos ensaio com dH_2O e PBS 1% (*v/v*) revelam-se de acordo com o que está ditado na literatura (Campos *et al.*, 2009; Ramasamy & Shanmugam, 2015; Sato *et al.*, 2020).

8. Ensaio de degradação

De forma a avaliar a perda de massa das amostras ao longo do tempo através do contacto direto com meio líquido, PBS 1% (*v/v*) durante 34 dias e dH_2O durante 19 dias, foram feitas pesagens e os cálculos da respetiva percentagem de perda de massa, nos dias 1,7,19, 29 e 34, estando os resultados apresentados nas **Figuras 40** (em PBS), **41** (em dH_2O) e **Tabela 9.**

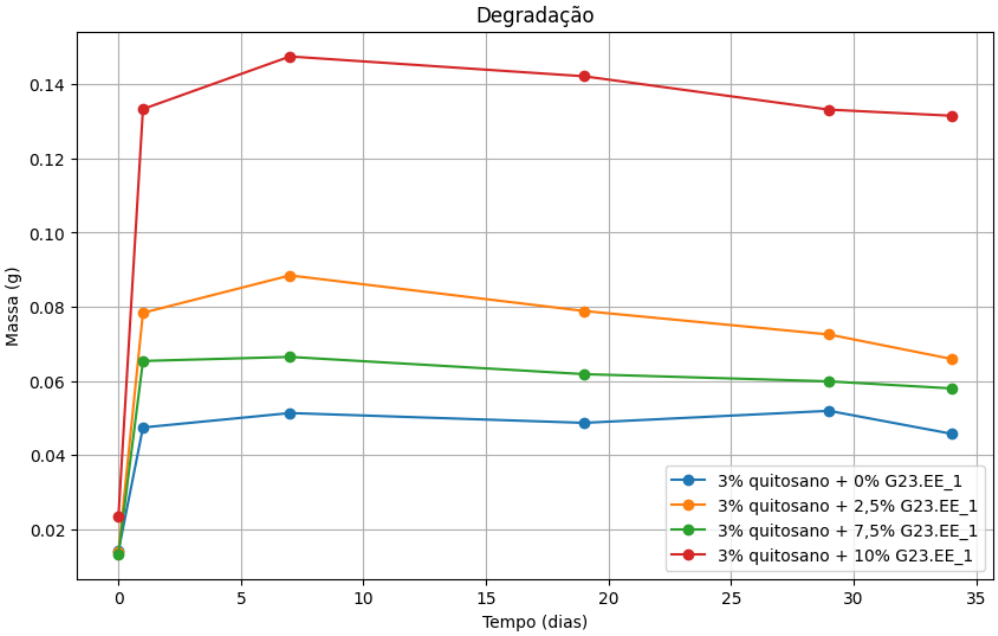


Figura 40: *Representação gráfica das pesagens ensaio de degradação com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de PBS 1% (v/v)*

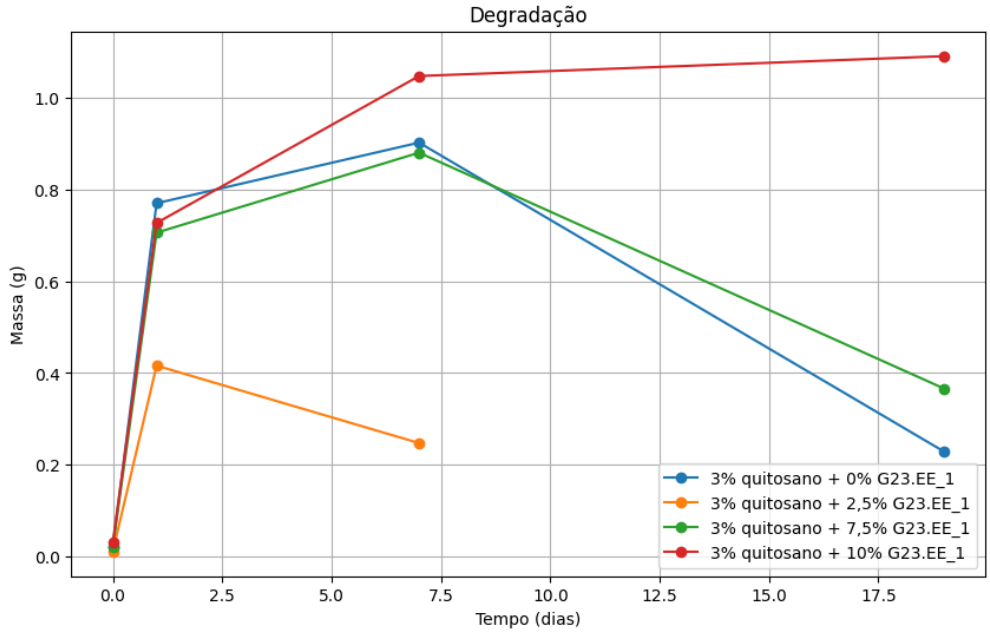


Figura 41: *Representação gráfica das pesagens ensaio de degradação com respetivo registo do aumento de massa em função do tempo de imersão dos filmes na solução de dH_2O.*

***Tabela 9**: Representação do cálculo da percentagem de perda de massa, das amostras ao longo de 34 dias para o ensaio de PBS e 19 dias para o ensaio de dH_2O.*

% perda de massa	3% quitosano + 0,5% AA	3% quitosano + 0,5% AA + 2,5% G23.EE	3% quitosano + 0,5% AA + 7,5% G23.EE	3% quitosano + 0.5% AA + 10% G23.EE
PBS 1% (*v/v*)	213,07%	402,59%	361,84%	469,70%
dH_2O	252,36%	2500%	3563,04%	3492,23%

De forma a aferir as alterações de forma, cor e tamanho das amostras no fim dos ensaios com ambos os meios líquidos, foram fotografadas e as suas comparações encontram-se posteriormente representadas na Figura 42 (A,B e C4: amostras depois do ensaio em dH_2O; A,B e C5: amostras depois do ensaio em PBS 1%) .

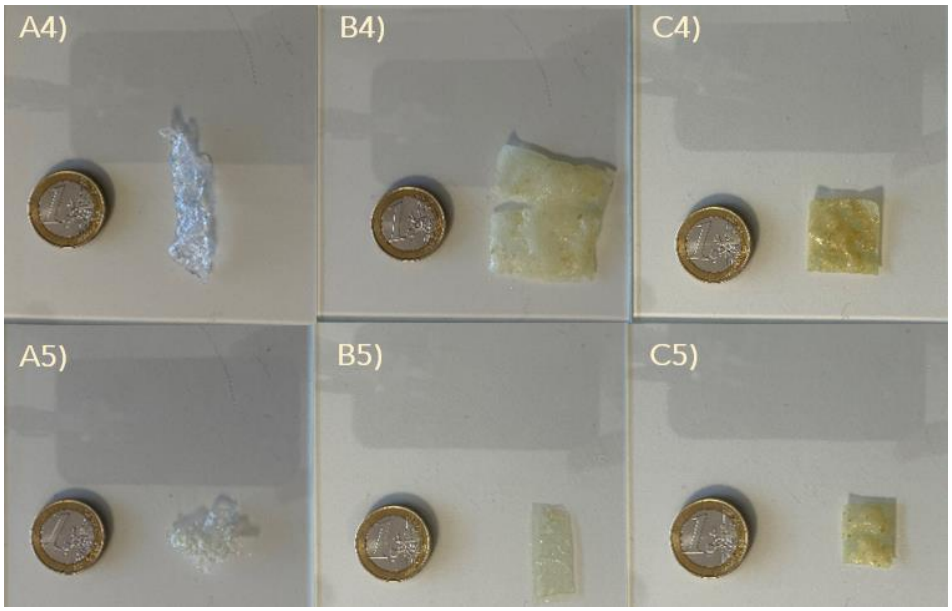


***Figura 42:** Comparação da alteração das amostras depois do ensaio em dH_2O **A4**) 3% Ch + 0,5% AA; **B4**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **C4**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE com as amostras depois do ensaio em PBS: **A5**) 3% Ch + 0,5% AA; **B5**) 3% Ch + 0,5% AA + 7,5% G23.EE; **C5**) 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE*

Através da análise das Figuras 40, 41 e 42 bem como dos resultados apresentados na Tabela 9 pode confirmar-se que, apesar de não ser possível detetar a perda de massa em nenhuma das amostras analisadas em nenhum dos meios líquidos, é distinguível uma tendência comportamental dos filmes para que, no futuro, se inicie um período caracterizado pela perda de massa. Comparando os dois ensaios é possível ainda, destacar o ensaio de dH_2O por refletir resultados com maior variabilidade de massa. Em que as amostras iniciam o ensaio com um aumento de massa bastante elevado, seguindo para uma fase, dia

7, de início de perda de massa em todas as amostras exceto no filme com 10% G23.EE. Esta foi a única amostra cuja perda de massa não foi denotada ao longo de todo o tempo de ensaio e cuja integridade física se manteve em melhor estado quando comparada com as outras amostras analisadas indo de encontro à teoria de que, o própolis tem a capacidade de aumentar a absorção de água e auxiliar na manutenção da estrutura intermolecular nos materiais nos quais é incorporado (Corrêa *et al.*, 2020; Sato *et al.*, 2020; Pu *et al.*, 2023). Este mesmo facto pode explicar a dificuldade de perda de massa ao fim de mais de 15 dias de ensaio, destacando a amostra pura como a que refletiu mais perda de massa e deformação. Por sua vez, a amostra com 2,5% G23.EE não conseguiu manter a sua integridade durante os 19 dias de ensaio pelo que, dados relativos à sua massa apenas foram retirados apenas até ao 7º dia. Na Figura 42 é ilustrada a deformação das amostras analisadas ao fim do tempo do ensaio, aferindo-se um grau superior de alteração da forma, cor e tamanho das amostras no ensaio com dH_2O.

Relativamente ao ensaio realizado em PBS 1% (*v/v*) os resultados são similares, de forma geral, sendo visível um aumento de massa inferior em todas as amostras justificado pelo comportamento de *swelling* confirmados no ensaio anterior (Tabela 8), comprovando que, tanto o polímero utilizado como o própolis são materiais com maior afinidade à água (Ramasamy & Shanmugam, 2015; Sato *et al.*, 2020). No entanto, apesar de mais comprido, neste ensaio as amostras mantiveram a sua integridade durante os 29 dias.

Conclui-se, de forma similar ao que terá sido relatado no ensaio de *swelling*, as amostras refletiram um comportamento semelhante à literatura relativamente a outros materiais com Ch e própolis (Campos *et al.*, 2009; Ramasamy & Shanmugam, 2015; Sato *et al.*, 2020; Corrêa *et al.*, 2020; Pu *et al.*, 2023). Adicionalmente, interpolando estes resultados para a aplicação do material em contexto de lesão cutânea, presume-se que o facto do filme com 10% G23.EE ter absorvido mais dH_20 e PBS, mantendo a sua integridade durante todo o ensaio e ter perdido menos massa pode ser um forte indicador da sua capacidade de absorção de exsudatos. Assim, este filme surge como um potencial tratamento para feridas com elevadas quantidades de exsudatos, onde o desbriamento excessivo é um fator preocupante.

9. Ensaio de tração

Com o objetivo de caracterizar mecanicamente os filmes desenvolvidos, principalmente as diferenças aquando da incorporação do própolis no material, foram efetuados ensaios mecânicos que permitiram registar o comportamento do material quando sujeito a forças de tração. Os resultados encontram-se representados nas Figuras 43 e 44.

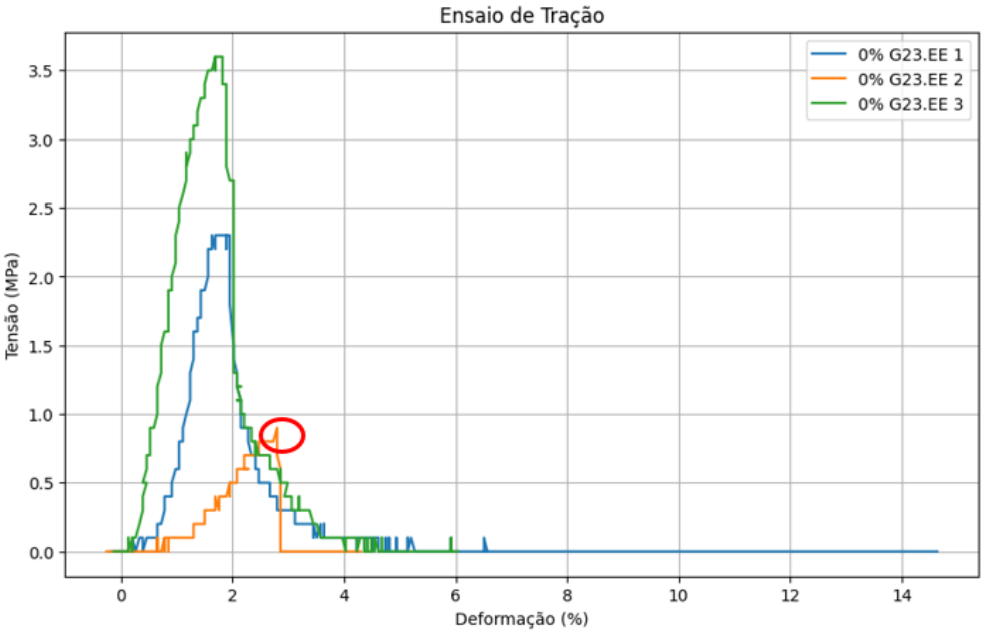


Figura 43: *Representação gráfica do ensaio de tensão/deformação na amostra de 3% Ch + 0,5% AA; foram feitas 3 réplicas (1,2 e 3)*

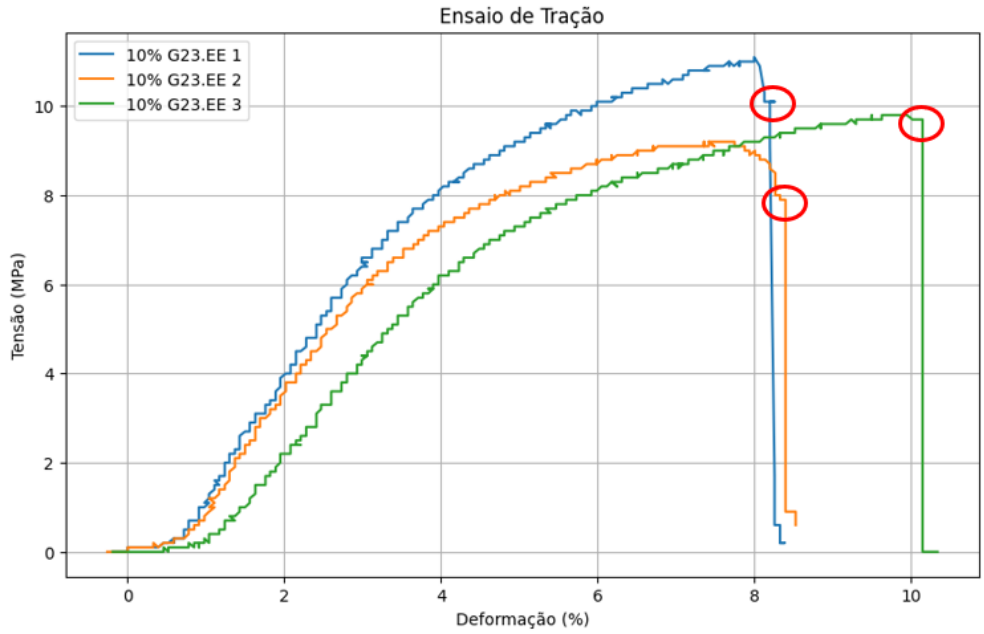


Figura 44: *Representação gráfica do ensaio de tensão/deformação na amostra de 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE, foram feitas 3 réplicas (1,2 e 3)*

Neste ensaio o principal propósito foi destacar e comparar a alteração da resposta à força mecânica de um filme sem própolis com um filme com própolis. Desta forma, foram usadas amostras de filmes de Ch puro e filmes com 10% G23.EE sobre os quais foram aplicadas forças mecânicas com as mesmas intensidades registando o comportamento do material até à rotura total em ambas as amostras, cada uma delas com 3 réplicas que se encontram representadas nos gráficos das Figuras 43 e 44. Nos dois gráficos apresentados é possível destacar o mesmo tipo de comportamento dos materiais. Inicialmente destaca-se uma resposta linear, correspondendo ao regime elástico de deformação em que o filme recupera a sua forma caso fosse retirado o estímulo e, de seguida, a resposta não linear correspondente à deformação plástica do material a partir do qual a deformação se torna permanente, sendo caracterizada pela rotura total do filme que surge nos gráficos das Figuras 43 e 44 com um círculo vermelho.

Uma das principais diferenças destacáveis na comparação dos dois ensaios é a diversidade de resposta de cada réplica no ensaio com amostras de Ch puro, destacando-se amostras capazes de suportar mais deformação que outras. Ademais, apenas uma das amostras apresenta um momento de rotura completo, nas duas outras réplicas (1 e 3) o filme não quebra por completo, existem zonas em que há menos resistência, quebrando primeiro, e zonas com mais resistência, que serão as últimas a quebrar, surgindo aí a rotura completa do material. Os resultados indicam que além da heterogeneidade entre réplicas se destaca heterogeneidade entre zonas da própria amostras. De forma geral, o material sem própolis é menos resistente, combinando num valor de deformação médio de 2,13%. Existem estudos que comprovam esta característica do Ch como polímero, sendo os materiais com base neste material descritos como inflexíveis, rígidos e quebradiços (Escárcega-Galaz *et al.*, 2018). Tendo já sido adotadas alternativas a esta limitação através da incorporação de compostos/materiais plásticos como mel, celulose, curcuma, entre outras (Escárcega-Galaz *et al.*, 2018; López-Mata *et al.*, 2018; Madian *et al.*, 2023).

Nas amostras com própolis destaca-se a diferença nos valores de tensão que são consideravelmente superiores, bem como a homogeneidade entre amostras e força de cada amostra como um só, combinando num valor de deformação médio de 8,77%. Cada amostra reflete um comportamento, inicialmente elástico ao estímulo mecânico que depois passa a plástico, chegando ao ponto de rotura total do filme. Através da presente comparação é possível concluir que o própolis melhora as capacidades de resistência mecânica dos filmes de Ch bem como permite que seja atingida homogeneidade de resposta em todas as amostras. Este efeito já terá sido descrito em estudos anteriores, comprovando a melhoria das capacidades mecânicas em materiais enriquecidos com própolis (Sani *et al.*, 2021; Stanicka *et al.*, 2021; Stefanowska *et al.*, 2024).

A capacidade do própolis melhorar as propriedades mecânica em filmes de Ch permite que este material seja indicado para a aplicação em feridas cutâneas, já que, independentemente do local da lesão é inevitável que o movimento do paciente não afete a integridade física do material usado como terapia. Desta forma, melhorando a sua resistência é possível que se torne uma solução mais cómoda, permitindo que o paciente realize toda e qualquer tarefa sem danificar a estrutura do filme e, portanto, a sua ação.

10. Ensaio de espetroscopia no Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar as propriedades óticas dos filmes de Ch e própolis. O resultado da absorbância dos filmes ao feixe de luz UV-Vis encontra-se representado na Figura 45.

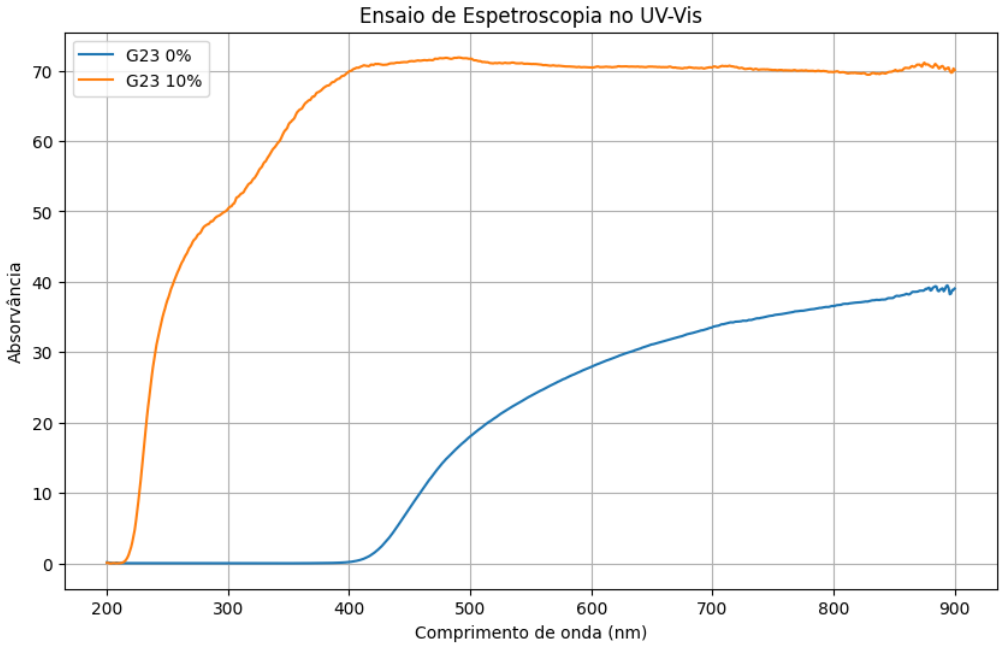


***Figura 45**: Representação gráfica dos valores de absorvância dos filmes 3% Ch + 0,5% AA (**azul**) e 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE (**laranja**) ao feixe de luz UV-Vis.*

Através da análise do gráfico da Figura 45 é possível inferir que o filme puro absorve radiação apenas a partir dos 450 nm, característica do Ch, particularizado pela sua transparência, conforme indica e comprova a literatura (Iturriaga *et al.*, 2014). Em contrapartida é observado que o filme com 10% G23.EE, absorve na zona dos UVs (200-400 nm), absorvendo praticamente em todos os comprimentos de onda testados. Esta alteração era expectável pelas características do própolis, já que uma das suas limitações aquando o seu manuseamento é a sua termo e fotossensibilidade (Paviani *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2020), em contrapartida, esta característica já foi, por sua vez, ferramenta que permitiu usa-lo como foto sensor (Mezdari & Khirouni, 2022).

Desta forma já terá sido ditada a utilidade da incorporação de compostos naturais em filmes de Ch com o objetivo de diminuir a sua transparência à incidência de radiação UV-Vis, aumentando, consequentemente, a sua absorvância (Iturriaga *et al.*, 2014; Kalaycıoğlu *et al.*, 2017). Esta alteração pode ser indicação de que a incorporação de extrato de própolis auxilia na prevenção da oxidação lipídica induzida por luz UV-Vis (Iturriaga *et al.*, 2014), sendo ademais, a inserção de própolis em formulações de quitosano uma das estratégias atualmente usadas para este fim (Matei *et al.*, 2015; De Carli *et al.*, 2022 Phonrachom *et al.*, 2023).

11. Ensaios antimicrobianos

11.1. Ensaios para deteção de halos de inibição

Com o propósito de avaliar propriedades antimicrobianas do filme com própolis em comparação com o filme sem própolis foi realizado um ensaio que funciona através do contacto direto do material devidamente esterilizado com uma suspensão bacteriana, de *B. subtillis* neste caso, inoculada em meio LBA. O motivo que levou à adoção desta abordagem de teste foi aferir o funcionamento do material mediante a sua aplicação, que será preferencialmente dérmica. Desta forma, este ensaio tem como princípio a avaliação da capacidade de difusão do própolis desde o filme onde está incorporado até ao meio onde é inserido e a sua consequente capacidade antimicrobiana, sendo este um processo mais lento e limitado.

Para realização deste ensaio foram utilizadas porções com 3,14 cm^2 de área de cada um dos filmes impressos, cujo volume de formulação seria aproximadamente 1 mL por amostra testada. A realização do ensaio com as amostras de Ch puro, com 2,5% G23.EE e 7,5% G23.EE não apresentaram qualquer halo de inibição. Um dos resultados deste ensaio do filme com 7,5% G23.EE encontra-se apresentado na **Figura 46**. A letra A) representa o filme testado, a letra B) representa o controlo com G23.EE e a letra C) representa o controlo com EtOH absoluto.



***Figura 46**: Resultado do ensaio por halo de inibição do filme com 7,5% G23.EE. **A**) Filme **B**) Controlo G23.EE **C**) Controlo EtOH 100%*

No exemplo apresentado na Figura 46 é possível observar o halo de inibição formado pelos 2 controlos usados, contrariamente ao resultado apresentado pela ação do filme em teste. Por sua vez, nos ensaios do filme com 10% G23.EE o mesmo não se sucedeu, aliás, este foi o único filme cujos halos de inibição são evidentes nas placas ao fim de 24 h de incubação a 37 °C. Exemplos desses resultados encontram-se representados nas Figura 47 e 48.

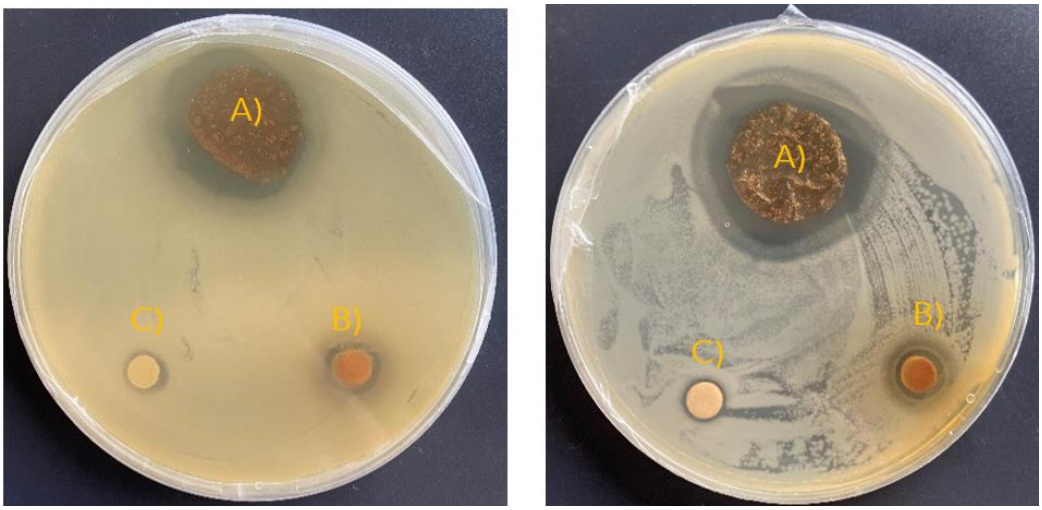


***Figura 47** e **48**: Resultados de duas réplicas do ensaio por halo de inibição no filme com 10% G23.EE. **A**) Filme; **B**) Controlo G23.EE; **C**) Controlo EtOH 100%*

Foram realizadas 6 réplicas independentes em 3 ensaios do filme com 10% G23.EE, a medição dos seus halos de inibição e respetivas médias encontram-se na Tabela 10.

***Tabela 10**: Média das medições dos halos de inibição (mm) dos ensaios com as amostras 3% quitosano + 0,5% AA + 10% G23.EE*

	Média da medição dos halos de inibição (mm)
Ensaio 1 (Placa 1 e 2)	4,25
Ensaio 2 (Placa 3 e 4)	1,25
Ensaio 3 (Placa 5 e 6)	1,38

Conforme sugerido na literatura, qualquer halo de inibição deve ser medido em milímetros e, apresentando um valor superior a 18 mm, é considerado como relevante e clinicamente eficaz, não sendo atualmente possível desconsiderar outros resultados, mesmo que apresentem medições com valores inferiores, pela diferença na espécie de microrganismo e meio usados em cada ensaio (Schaechter, 2009; Healy *et al.*, 2017; Kishore, 2021). Desta forma, é possível considerar os resultados como prova de que, apenas os filmes com G23.EE, numa percentagem de, pelo menos, 10% mostram atividade antimicrobiana. Destaca-se, ainda, a relevância destes resulrados pelas capacidades antimicrobianas já reconhecidas do

polímero, supondo-se que poderia existir a possibilidade da sinergia entre os dois compostos naturais causar problema nos resultados deste ensaio, anulando-os (Kalaycıoğlu *et al.*, 2017). Isto é, a capacidade antimicrobiana do polímero poderia, de alguma forma, alterar a ação do extrato de própolis contra o microrganismo anteriormente testado sobre o qual mostrou atividade. Tal não se verificou, sendo, portanto, possível considerar que a capacidade antimicrobiana do própolis aquando incorporada no filme de Ch tem uma capacidade de ação superior e funcional.

Ademais, através da análise conjunta destes resultados e dos apresentados no ensaio SEM (CAPÍTULO III: Secção 5.) foi possível detetar que a acumulação e cristalização do própolis se localiza na superfície dos filmes e não no seu interior, não sendo dependente do aparecimento/desenvolvimento de poros intermoleculares para se difundir para o meio. Em conjunto com os resultados obtidos no presente ensaio antimicrobiano existem dados suficientes para afirmar que a ação antimicrobiana do material em estudo não depende da comunicação intermolecular do filme, trata-se de uma ação direta e dependente do contacto com o meio. Desta forma, podemos ainda pressupor que o filme se encontra "organizado" por camadas: uma camada de própolis cristalizado (superfície), uma camada intermédia de Ch e uma outra camada de própolis cristalizado (superfície).

Para além disso, tendo em conta também a análise dos resultados dos ensaios de *swelling* e degradação realizados podemos afirmar que o funcionamento deste material aquando da sua aplicação no leito da ferida seria possivelmente dividido em 3 fases distintas. Após aplicação, a ação antimicrobiana seria iniciada imediatamente, pela difusão do própolis, já que depende unicamente do contacto da superfície do material com o leito da ferida, impedindo a progressão de uma infeção microbiana. De seguida iniciar-se-ia uma fase de inchamento da membrana, em que os exsudatos da ferida seriam absorvidos impedindo desbriamento excessivo. Posteriormente o material daria inicio a uma fase de degradação pela superfície até ao centro, em que o contacto com o Ch será mais acentuado. Como este composto possui também capacidades antimicrobianas e ainda, proliferativas, presume-se que seria dada uma continuidade de resposta antimicrobiana, anti-inflamatória e moduladora da proliferação celular e melhoria da elasticidade cutânea (pela modulação de colagénio III) a fim de regenerar uma nova camada cutânea (Amir Qureshi, 2015; Tottoli *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Por fim, esta nova camada alcançaria a superfície contrária da aplicação onde a ação de nutrição tópica do própolis na nova camada cutânea seria crucial na maturação do tecido (Sforcin & Bankova, 2011; Sforcin, 2016; Yang *et al.*, 2022).

11.2. Ensaios por morte por contacto ou *contact killing*

Com o propósito de avaliar a capacidade antimicrobiana dos filmes em todas as superfícies, neste ensaio, uma porção de cada uma das amostras (Ch puro; 2,5% G23.EE; 7,5% G23.EE e 10% G23.EE), com a mesma área e forma que a utilizada anteriormente, foi colocada em contacto direto com uma suspensão bacteriana de MSSA em agitação durante 2 h a 37 °C. Os resultados em UFC (unidades formadoras de colónias) encontram-se representados na Figura 49. Importante denotar que o controlo se trata de uma suspensão bacteriana sem qualquer amostra.

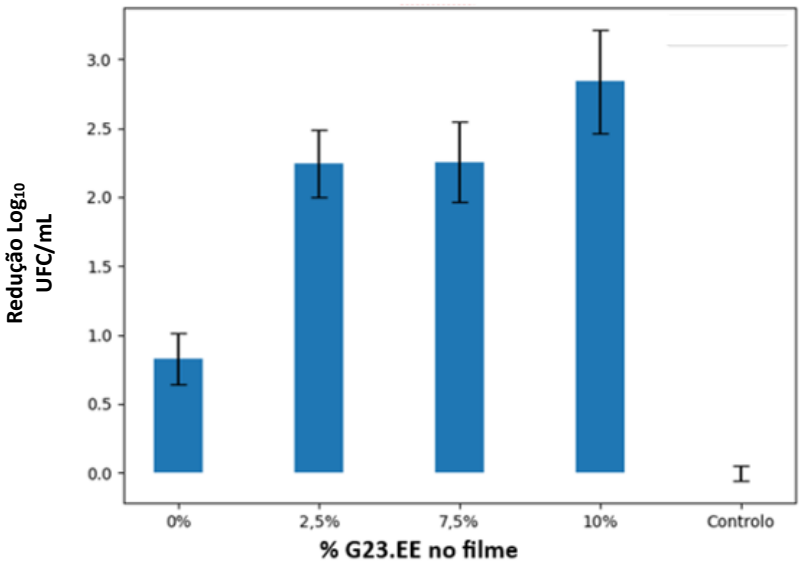


Figura 49: *Representação gráfica dos resultados (em redução de Log_{10} UFC/mL) do ensaio por contact killing de amostras com 0% G23.EE (Ch puro); 2,5% G23.EE; 7,5% G23.EE e 10% G23.EE*

Contrariamente ao que terá sido observado nos resultados do ensaio anterior, registou-se um efeito antimicrobiano (Figura 49), que parece depender da concentração. Ademais, mesmo no filme de Ch puro existe um efeito inibitório do crescimento microbiano representado por um valor de Log_{10} de, quase, 1,0 UFC/mL. A capacidade antimicrobiana do Ch encontra-se amplamente descrita na literatura e resulta da interação entre as cargas positivas deste polímero do seu grupo amina com as cargas negativas presentes na parede celular das células bacterianas, formando-se consequentemente poros e, ocorrendo lise celular (Dragland *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2019).

Relativamente às amostras com própolis, os resultados obtidos estão de acordo com a literatura que descreve a sua atividade antimicrobiana e demonstra o seu potencial e eficácia em diversas abordagens (Antezana *et al.*, 2022; Melo *et al.*, 2024; Vieira *et al.*, 2024). Da mesma forma, os resultados obtidos com o G23.EE em suspensão e imobilizado em matriz polimérica de Ch indicam a sua atividade antimicrobiana. Destaca-se a diferença entre o valor Log_{10} do filme com 10% G23.EE (2,84 UFC/mL) quando comparado

com todos os outros (2,25 UFC/mL no filme com 2,5% G23.EE e 2,26 UFC/mL no filme com 7,5% G23.EE).

Relativamente à amostra com 10% G23.EE os resultados do ensaio de *contact killing* encontram-se em concordância com o ensaio de halo de inibição. Indicando que esta poderá ser a formulação que se adequa melhor às aplicações antimicrobianas em lesões cutâneas, conforme se pretendia assegurar. Ademais, com a confirmação nos resultados de *contact killing* podemos ainda garantir que a ação antimicrobiana dos filmes não é dependente de apenas uma das superfícies do material, já que todas as superfícies estavam em contacto com a suspensão bacteriana analisada e, no ensaio anterior apenas uma das superfícies se encontrava em contacto com a suspensão. Apesar das superfícies do material serem ligeiramente distintas (conforme referido no CAPÍTULO III: Secção 5.) devido à cristalização ao ar numa delas e cristalização em contacto com o substrato na outra, mesmo após esterilização com luz UV por 15 minutos de cada uma das superfícies, antes de cada ensaio antimicrobiano, nenhuma perdeu atividade antimicrobiana. Após as 2 h em agitação no ensaio por *contact killing* foi observado um aumento de massa (*swelling*) em todas as amostras, sendo de destacar que as amostras de Ch puro e 2,5% G23.EE acabaram por se desintegrar parcialmente, ao contrário das restantes.

Assim, os resultados obtidos revelaram a eficácia antimicrobiana dos filmes com Ch e própolis produzidos, encontrando-se de acordo com a literatura em materiais similares já desenvolvidos com propósitos de aplicação distintos. É o caso de biofilmes de Ch e própolis contra patógenos alimentares (como *L. monoctogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus, C. sakazakii, B. cereus*, e *S. typhimurium*) cujos valores de Log_{10} de inibição de crescimento microbiano em UFC/mL foram de 3,87 a 5,58 (Torlak & Sert, 2013). Mais recentemente, foi desenvolvido um biofilme de Ch e quitina reciclados incorporado com extrato de própolis português cujos resultados dos ensaios antimicrobianos contra microrganismos como *E.coli, S. aureus, B. cereus, Arthrobacter sp*, entre outros, comprova a atividade antimicrobiana do própolis e Ch combinados num único material (De Carli *et al.*, 2022). Ademais, neste último estudo o material sem própolis incorporado não foi capaz de apresentar resposta antimicrobiana. Tal como estes, outros estudos têm vindo a comprovar a capacidade antimicrobiana de materiais desenvolvidos com quitosano e própolis, de diferentes origens, na sua composição (Franca *et al.*, 2014; Stanicka *et al.*, 2021; Stefanowska *et al.*, 2024).

Desta forma, conclui-se, portanto, que o filme polimérico desenvolvido, impresso e devidamente testado e caracterizado com a formulação 3% Ch + 0,5% AA + 10% G23.EE demonstrou ter características físico-químicas e biológicas que revelaram a sua capacidade antimicrobiana e a sua estabilidade para futura

aplicação no tratamento de lesões cutâneas, refletindo um comportamento que, quando aplicado diretamente numa lesão cutânea poderá agir inibindo a infeção microbiana e auxiliando, simultaneamente, a proliferação celular de uma nova camada cutânea (Franca *et al.*, 2014; Abbaszadeh *et al.*, 2019; Corrêa *et al.*, 2020; Stanicka *et al.*, 2021). A vantagem que se sobrepõe às abordagens atualmente utilizadas como tratamento é a customização total da forma, tamanho e profundidade do filme impresso ser totalmente dependente do desenvolvimento simples e rápido de um novo ficheiro de *G-Code* adaptado à lesão que se pretende tratar, obtendo-se, em minutos um material de aplicação simples, funcional, natural, biocompatível e biodegradável.

CAPÍTULO IV: Conclusões e Perspetivas Futuras

1. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um material para o tratamento de lesões cutâneas capaz de ultrapassar as limitações dos atualmente disponíveis. Desta forma utilizaram-se produtos naturais como quitosano e extrato própolis do Gerês aos quais se aplicou uma técnica de manufatura aditiva (DIW) para obter um filme sustentável e costumizável para todos os tipos e morfologias de lesões. O estudo do própolis do Gerês ao longo da última década revelou várias bioatividades, como antimicrobiana (nomeadamente contra estirpes comumente encontradas em infeções de lesões cutâneas), antioxidante e anti-inflamatória, e ainda, contrariamente ao que é comum neste produto natural, exibe uma constância de perfis químico e de bioatividades ao longo dos anos, tornando-o particularmente interessante. Adicionalmente, a escolha do Ch como polímero deveu-se sobretudo às suas propriedades antimicrobiana, imunomoduladora e, ainda pela capacidade de promover a proliferação celular e maturação da nova camada cutânea formada após lesão, tendo já sido regularmente usado em vários materiais como terapia para o tratamento de lesões cutâneas.

Inicialmente foi realizado o estudo prévio dos parâmetros de qualidade amostra de G23 (conteúdo balsâmico, teor de cinzas, de ceras e de humidade) e, relativamente ao extrato etanólico da amostra G23.EE, a sua caracterização química e biológica também foi feita, alinhando-se os resultados obtidos com a literatura para própolis de origem portuguesa e com as análises de amostras do Gerês anteriores. Relativamente à capacidade antioxidante deste extrato, o valor obtido no ensaio de DPPH• (EC_{50} (μg/mL) 24,99 ± 1,40) relatou uma bioatividade inferior aos anteriores (*e.g.* EC_{50} (μg/mL) 13,37 ± 0,38 no G22.EE). A capacidade antimicrobiana deste extrato é descrita num espetro de atividade que é semelhante aos de outros extratos da mesma localidade e de anos distintos, tendo-se revelado ligeiramente menos reativo contra *Bacillus megaterium*. Tal alteração atribui-se a possíveis modificações micro-geográficas no local de origem do própolis. No entanto, destaca-se a sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* por ser comumente associada a infeções em lesões cutâneas (MIC foi 750 μg/mL).

Relativamente à análise química do extrato (TFT, TPT e TOT) os resultados também vão de encontro aos obtidos até então noutras análises de extratos de própolis do Gerês anteriores, tendo-se, na generalidade, sobressaído o valor de TFT (28,34 ± 1,98 mg QE/g extrato) quando comparado a outros extratos de própolis de choupo. A manutenção dos valores relativos a estas análises e a sua associação às

bioatividades deste compostos natural comprovaram a constância dos compostos bioativos ao longo dos anos. Depois de identificar o própolis e as características químicas e biológicas desejáveis, procedeu-se à sua incorporação numa matriz polimérica de Ch, otimização e caracterização físico-química dos filmes produzidos. O processo de otimização da formulação e impressão do filme teve como principal objetivo alcançar uma bio tinta passível de manter a *shape fidelity*, refletindo o ficheiro criado por *G-code* para impressão do filme, mantendo a sua morfologia após secagem. Deste processo terá resultado a preparação de uma biotinta de 3% Ch + 10% G23.EE (0,50 g/mL) + 0,5% AA cuja impressão se realizou por DIW numa impressora 3D pela técnica de MEX. A secagem das amostras foi realizada num ambiente sem luz, a 25 °C, durante ± 24 h. Depois de secas, as amostras são destacadas do substrato de PS.

Relativamente à caracterização físico-química destes materiais, a incorporação de própolis nas amostras revelou, no ensaio de SEM, que os filmes produzidos possuem uma estrutura homogénea com uma espessura média de 42,56 μm, sem presença de poros. Verificou-se ainda que cada amostra é proporcionalmente menos espessa quanto maior a concentração de própolis no filme. Através da realização do ensaio de ATR-FTIR, foi possível comprovar que a incorporação do própolis não alterou significativamente a estabilidade química do polímero, revelando a formação de ligações intermoleculares entre o polímero e o própolis, com a presença das bandas características destes materiais

No que concerne os resultados dos ensaios de inchamento, os filmes possuem elevada capacidade de absorção de PBS 1% v/v e dH_2O destacando-se, a dH_2O, com um ganho de massa que atingiu 754%, após 21 dias de ensaio. De forma similar, no ensaio de degradação, as amostras revelaram uma tendência de degradação principalmente com dH_2O. Os resultados de tração mecânica permitem perceber que a incorporação de G23.EE no filme na matriz de Ch funcionou com reforço mecânico, aumentando o valor de deformação médio de 2,13% para 8,77%. No que concerne os resultados do ensaio de espetroscopia no UV-Vis foi observado um aumento significativo no valor de absorvância da amostra sem própolis *versus* com própolis, passando de absorvância apenas na região visível do espectro electromagnético, > 450 nm na amostra de Ch para uma absorbância que inclui a zona da radiação UV, entre 200-400 nm, característica do própolis pela sua reconhecida fotossensibilidade.

Por fim, em relação aos resultados dos ensaios antimicrobianos dos filmes (halo de inibição e *contact killing)* indicaram a amostra com 10% G23.EE como sendo a mais promissora. No primeiro ensaio, a amostra deu origem a um halo de inibição nítido contra *Bacillus subtillis* e os resultados do segundo ensaio com MSSA indicaram um aumento de quase, 1,0 UFC/mL no filme de Ch puro para 2,84 UFC/mL no

filme de 10% G23.EE revelando-se a incorporação de G23.EE no filme uma abordagem funcional para melhoria das capacidades antimicrobianas no filme polimérico.

Desta forma, tanto a caracterização química e biológica do G23 e G23.EE como a análise físico-química e biológica dos filmes de quitosano + G23.EE + ácido acético demonstraram a obtenção de uma formulação estável e imprimível com as propriedades físico-químicas necessárias para a aplicação no tratamento de lesões cutâneas.

2. Perspetivas futuras

Todos os objetivos delineados nesta dissertação de mestrado foram cumpridos, sendo simultaneamente proposta uma nova estratégia com aplicabilidade em estudos para o tratamento e cicatrização de lesões cutâneas.

Desta forma, sugerem-se os seguintes trabalhos para um melhor estudo e desenvolvimento dos materiais:

- Ensaios antimicrobianos dos filmes contra outras estirpes de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo;
- Avaliação da citotoxicidade dos materiais através de ensaios de aplicação dos filmes desenvolvidos em contacto com linhas celulares;
- Desenvolvimento de filmes multicamada com diferentes polímeros ou incorporando diferentes extratos de própolis nas diferentes camadas

CAPÍTULO V: Bibliografia

Abbaszadeh, A., Rajabzadeh, A., & Zarei, L. (2019). Effect of chitosan/propolis biodegradable film on full-thickness wound healing in rats. *Iranian Journal of Veterinary Surgery*, *14*(1), 9–17.

Abeyewickreme, A., Kwok, A., McEwan, J. R., & Jayasinghe, S. N. (2009). Bio-electrospraying embryonic stem cells: interrogating cellular viability and pluripotency. *Integrative Biology*, *1*(3), 260–266.

Abu-Al-Basal, M. A. (2010). Healing potential of Rosmarinus officinalis L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *131*(2), 443–450. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.007

Afroz, S., Sarkar, D., Khatun, K., Khan, T. M., & Paul, S. (2020). Bacterial pathogens in wound infection and their antimicrobial susceptibility pattern in a medical college hospital, in Dhaka, Bangladesh. *International Journal of Research in Medical Sciences*, *8*(6), 2105.

Agarwala, S. (2016). A perspective on 3D bioprinting technology: Present and future. *Am. J. Eng. Applied Sci*, *9*, 985–990.

Agarwala, S., & Yeong, W. Y. (2016). *3D printed electronic tracks for bio-integrated free-form devices*.

Ahmed, M., Amirat, M., Aissat, S., Aissa, M. A., & Khiati, B. (2020). FTIR characterization of Sahara honey and propolis and evaluation of its anticandidal potentials. *Acta Scientifica Naturalis*, *7*(3), 46–57.

Ajdary, R., Reyes, G., Kuula, J., Raussi-Lehto, E., Mikkola, T. S., Kankuri, E., & Rojas, O. J. (2021). Direct ink writing of biocompatible nanocellulose and chitosan hydrogels for implant mesh matrices. *ACS Polymers Au*, *2*(2), 97–107.

Akhtar, K., Khan, S. A., Khan, S. B., & Asiri, A. M. (2018). *Scanning electron microscopy: Principle and applications in nanomaterials characterization*. Springer.

Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines*, *5*(1), 2.

Alarjani, K. M., Yehia, H. M., Badr, A. N., Ali, H. S., Al-Masoud, A. H., Alhaqbani, S. M., Alkhatib, S. A., Rady, A. M., & Abdel-Maksoud, M. (2024). Antimicrobial impact of a propolis/PVA/chitosan composite and its prospective application against methicillin resistance bacterial infection. *Frontiers in Nanotechnology*, *6*, 1387933.

Albanesi, C., & Pastore, S. (2010). Pathobiology of Chronic Inflammatory Skin Diseases: Interplay Between Keratinocytes and Immune Cells as a Target for Anti-Inflammatory Drugs. *Current Drug Metabolism*, *11*(3), 210–227. https://doi.org/10.2174/138920010791196328

Almeida, C. R., Serra, T., Oliveira, M. I., Planell, J. A., Barbosa, M. A., & Navarro, M. (2014). Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: Unraveling the effect of 3-D structures on inflammation. *Acta Biomaterialia*, *10*(2), 613–622. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.035

Almine, J. F., Wise, S. G., & Weiss, A. S. (2012). Elastin signaling in wound repair. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, *96*(3), 248–257. https://doi.org/10.1002/bdrc.21016

Almuhayawi, M. S. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *27*(11), 3079–3086. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016

Altuntas, S., Dhaliwal, H. K., Bassous, N. J., Radwan, A. E., Alpaslan, P., Webster, T., Buyukserin, F., & Amiji, M. (2019). Nanopillared chitosan/gelatin films: a biomimetic approach for improved osteogenesis. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *5*(9), 4311–4322. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00426

Aly, S. A., & Elewa, N. A. (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of Aspergillus versicolor and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. *Journal of Dairy Research*, *74*(1), 74–78.

Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *40*(5).

Amir Qureshi, M. (2015). An Overview on Wounds Their Issues and Natural Remedies for Wound Healing. *Biochemistry & Physiology: Open Access*, *04*(03). https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000165

Ananthapadmanaban, D. (2018). Summary of some selected characterization methods of geopolymers. In *Geopolymers and Other Geosynthetics*. IntechOpen.

Andriotis, E. G., Eleftheriadis, G. K., Karavasili, C., & Fatouros, D. G. (2020). Development of bio-active patches based on pectin for the treatment of ulcers and wounds using 3D-bioprinting technology. *Pharmaceutics*, *12*(1), 56. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010056

Androcioli, H. G., Menezes Júnior, A. de O., Hoshino, A. T., & Androcioli, L. G. (2012). *Produtos alternativos no controle da Hemileia vastatrix (Berkeley & Broome) e Cercospora coffeicola (Berkeley & Cooke) em cafeeiros*.

Antezana, P. E., Municoy, S., Álvarez-Echazú, M. I., Santo-Orihuela, P. L., Catalano, P. N., Al-Tel, T. H., Kadumudi, F. B., Dolatshahi-Pirouz, A., Orive, G., & Desimone, M. F. (2022). The 3D Bioprinted Scaffolds for Wound Healing. *Pharmaceutics*, *14*(2), 1–46. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020464

Antunes, B. P., Moreira, A. F., Gaspar, V. M., & Correia, I. J. (2015). Chitosan/arginine–chitosan polymer blends for assembly of nanofibrous membranes for wound regeneration. *Carbohydrate Polymers*, *130*, 104–112.

Araújo, C., Oliveira, R. D., Pinto-Ribeiro, F., & Almeida-Aguiar, C. (2022). An Insight on the Biomedical Potential of Portuguese Propolis from Gerês. *Foods*, *11*(21), 3431.

Archaina, D., Rivero, R., Sosa, N., & Baldi Coronel, B. (2015). Influence of the harvesting procedure and extracting process on the antioxidant capacity of ethanolic propolis extracts. *Journal of Apicultural Research*, *54*(5), 474–481.

Archin, T., Ownagh, A., Tehrani, A. A., & Keshipour, S. (2024). Application of Propolis Ethanol Extract and Propolis Nanoemulsion in Treatment of Cutaneous Infection in Rabbit. *Iranian Journal of Veterinary Surgery*, *19*(1), 8–18.

Arooj, I., Noor, M., Jabbar, N., & Javaid, A. (2023). Prevalence and Antibiotic Sensitivity Testing of Bacteria Isolated from Open Wounds of Hospitalized Patients. *Advancements in Life Sciences*, *10*(2), 180–185.

Articles, O. (2020). *Antibacterial activity of chitosan / collagen membranes containing red propolis extract*. *75*(2012), 75–81. https://doi.org/19.1691/ph.2020.9050

Ashammakhi, N., Ahadian, S., Xu, C., Montazerian, H., Ko, H., Nasiri, R., Barros, N., & Khademhosseini, A. (2019). Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue

constructs. *Materials Today Bio*, *1*, 100008.

Ausili, A., Sánchez, M., & Gómez-Fernández, J. C. (2015). Attenuated total reflectance infrared spectroscopy: A powerful method for the simultaneous study of structure and spatial orientation of lipids and membrane proteins. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, *4*(2), 159–170.

Ayyanar, M., & Ignacimuthu, S. (2009). Herbal medicines for wound healing among tribal people in Southern India: Ethnobotanical and scientific evidences. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, *2*(3), 29–42.

Babiker, K. S., Idrees, M. D. A., Alumagadam, B. S., & Osman, T. M. (2020). Efficacy of propolis extract against S. aureus, P. aeruginosa, and K. pneumoniae strains isolated from patients with wound infection. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, *8*(5), 269–272.

Bagheri, B., Zarrintaj, P., Samadi, A., Zarrintaj, R., Ganjali, M. R., Saeb, M. R., Mozafari, M., Park, O. O., & Kim, Y. C. (2020). Tissue engineering with electrospun electro-responsive chitosan-aniline oligomer/polyvinyl alcohol. *International Journal of Biological Macromolecules*, *147*, 160–169.

Bahçeci, İ. (2020). Microorganisms that reproduce in wound cultures in Rize region and their antimicrobial susceptibility. *Middle Black Sea Journal of Health Science*, *6*(3), 358–368.

Balderas-Cordero, D., Canales-Alvarez, O., Sánchez-Sánchez, R., Cabrera-Wrooman, A., Canales-Martinez, M. M., & Rodriguez-Monroy, M. A. (2023). Anti-Inflammatory and Histological Analysis of Skin Wound Healing through Topical Application of Mexican Propolis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(14), 1–19. https://doi.org/10.3390/ijms241411831

Baldin, D., Scariot, E., Telaxka, F. J., Jaski, J. M., Franzener, G., Moura, G. S., & Grosselli, M. A. (2014). Indução de faseolina em feijão e na atividade antibacteriana sobre Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli pelo extrato etanólico de própolis. *Cadernos de Agroecologia [Volumes 1 (2006) a 12 (2017)]*, *9*(1).

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1–2), 114–117.

Bankova, V., & Popova, M. (2023). Propolis: Harnessing Nature's Hidden Treasure for Sustainable Agriculture. *Agrochemicals*, *2*(4), 581–597.

Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., & Sabatini, A.-G. (2002). Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *57*(5–6), 530–533.

Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2018). The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry*, *155*, 1–11.

Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, *31*(1), 3–15.

Bankova, V., Trusheva, B., & Popova, M. (2021). Propolis extraction methods: A review. *Journal of Apicultural Research*, *60*(5), 734–743.

Bankova3, V., Christov3, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C., & Popov, S. (1995). Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *50*(3–4), 167–172.

Bapat, S., Nagarajappa, R., Ramesh, G., & Bapat, K. (2021). Effect of propolis mouth rinse on oral microorganisms—A randomized controlled trial. *Clinical Oral Investigations*, 1–8.

Barnett, S. E., & Varley, S. J. (1987). The effects of calcium alginate on wound healing. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, *69*(4), 153–155.

Barroso, P. R., Lopes-Rocha, R., Pereira, E. M. F., Marinho, S. A., de Miranda, J. L., Lima, N. L., & Verli, F. D. (2012). Effect of propolis on mast cells in wound healing. *Inflammopharmacology*, *20*, 289–294.

Barud, H. da S., De Araújo Júnior, A. M., Saska, S., Mestieri, L. B., Campos, J. A. D. B., De Freitas, R. M., Ferreira, N. U., Nascimento, A. P., Miguel, F. G., Vaz, M. M. D. O. L. L., Barizon, E. A., Marquele-Oliveira, F., Gaspar, A. M. M., Ribeiro, S. J. L., & Berretta, A. A. (2013). Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*(1), 703024. https://doi.org/10.1155/2013/703024

Becerra, J., Sudre, G., Royaud, I., Montserret, R., Verrier, B., Rochas, C., Delair, T., & David, L. (2017). Tuning the hydrophilic/hydrophobic balance to control the structure of chitosan films and their protein release behavior. *AAPS PharmSciTech*, *18*, 1070–1083.

Bermeo, M. J. E., Avilés, H., Rodríguez, L. M. A., Granda, L. E. Á., Idrovo, L., Idrovo, M., & Oyola, C. (2019). Microbiological Evaluation And Chemical Composition Of Organic Extracts From Euphorbia aff. viridis (Klotzsch & Garcke) Boiss ON Staphylococcus Aureus, Klebsiella Pneumoniae AND Escherichia Coli. *La Granja*, *29*(1), 119.

Bessa, L. J., Fazii, P., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2015). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International Wound Journal*, *12*(1), 47–52.

Beteg, F., Vieilly, V., Fiţ, N., Mureşan, C., Gal, A., Stancu, B., Pascu, C., & Herman, V. (2019). *Propolis-an ancient remedy or a new paradigm for wound healing: in-vivo preclinical evaluation, antimicrobial activity and histopathologic aspects.*

Bhosale, S., Kumbhar, P., Patil, O., Landage, K., Kabade, R., Manjappa, A., & Disouza, J. (2021). Lyophilization: principle, methods, and applications. *Drug and Pharmaceutical Science Archives*, *1*(1), 19–23.

Bhubhanil, S., Talodthaisong, C., Khongkow, M., Namdee, K., Wongchitrat, P., Yingmema, W., Hutchison, J. A., Lapmanee, S., & Kulchat, S. (2021). Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s41598-021-01262-x

Bianchini, L., & Bedendo, I. P. (1998). Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia Agricola*, *55*(1), 149–152.

Binder, K. W., Allen, A. J., Yoo, J. J., & Atala, A. (2011). Drop-on-demand inkjet bioprinting: a primer. *Gene Therapy and Regulation*, *6*(01), 33–49.

Biscaia, D., & Ferreira, S. R. S. (2009). Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, *51*(1), 17–23. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2009.07.011

Boas, C. V. (2024). *A importância do estrato córneo no acne (e outros problemas de pele)*. https://catiavilasboas.com/a-importancia-do-estrato-corneo-no-acne-e-outros-problemas-de-pele/

Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound Healing Dressings

and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *97*(8), 2892–2923. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.21210

Bodeker, G. C., Ryan, T. J., & Ong, C. K. (1999). Traditional approaches to wound healing. *Clinics in Dermatology*, *17*(1), 93–98. https://doi.org/10.1016/S0738-081X(98)00056-X

Bonvehí, J. S., & Gutiérrez, A. L. (2012). The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*, 1351–1358.

Borbolla-Jiménez, F. V, Peña-Corona, S. I., Farah, S. J., Jiménez-Valdés, M. T., Pineda-Pérez, E., Romero-Montero, A., Del Prado-Audelo, M. L., Bernal-Chávez, S. A., Magaña, J. J., & Leyva-Gómez, G. (2023). Films for wound healing fabricated using a solvent casting technique. *Pharmaceutics*, *15*(7), 1914.

Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against Staphylococcus aureus and Candida albicans: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(4), 1936–1946. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063

Boudreau, M. D., & Beland, F. A. (2006). An evaluation of the biological and toxicological properties of Aloe barbadensis (Miller), Aloe vera. *Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*, *24*(1), 103–154. https://doi.org/10.1080/10590500600614303

Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., & Hancock, R. (2005). A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Current Protein and Peptide Science*, *6*(1), 35–51. https://doi.org/10.2174/1389203053027494

Braverman, I. M. (1989). Ultrastructure and organization of the cutaneous microvasculature in normal and pathologic states. *Journal of Investigative Dermatology*, *93*(2 SUPPL.), S2–S9. https://doi.org/10.1038/jid.1989.2

Bregg, R. K. (2005). *Current topics in polymer research*. Nova Publishers.

Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, *84*(3), 539–549. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x

Brito-Pereira, R., Moreira, J., Tubio, C. R., Fernandes, M. M., & Lanceros-Mendez, S. (2024). Enhancing antibacterial efficacy through propolis-infused electroactive polymers: A novel approach to combat antibiotic resistance. *Chemical Engineering Journal*, *496*, 154223. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.154223

Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, *529*(7586), 336–343.

Caetano, A. R., Oliveira, R. D., Celeiro, S. P., Freitas, A. S., Cardoso, S. M., Gonçalves, M. S. T., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2023). Phenolic Compounds Contribution to Portuguese Propolis Anti-Melanoma Activity. *Molecules*, *28*(7). https://doi.org/10.3390/molecules28073107

Caetano, A. R., Oliveira, R. D., Pereira, R. F. C., Cardoso, T. V., Cardoso, A., & Almeida-Aguiar, C. (2023). Examination of Raw Samples and Ethanol Extracts of Gerês Propolis Collected in Different Years. *Plants*, *12*(22), 1–14. https://doi.org/10.3390/plants12223909

Campos, M. G. N., Satsangi, N., Rawls, H. R., & Mei, L. H. I. (2009). Chitosan cross-linked films for drug delivery application. *Macromolecular Symposia*, *279*(1), 169–174.

Carvalho, G. J. L. de, & Sodré, G. da S. (2021). Application of propolis in agriculture. *Arquivos Do Instituto Biológico*, *88*, e0632019.

Çelemli, Ö. G., Atakay, M., & Sorkun, K. (2019). The correlation between botanical source and the biologically active compounds of propolis. *İstanbul Journal of Pharmacy*, *49*(2), 81–87.

Ceylan, S. (2021). Propolis loaded and genipin-crosslinked PVA/chitosan membranes; characterization properties and cytocompatibility/genotoxicity response for wound dressing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *181*, 1196–1206. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.069

Christov, R., Bankova, V., Hegazi, A., Hady, F. A. El, & Popov, S. (1998). Chemical composition of Egyptian propolis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *53*(3–4), 197–200.

Chua, C. K., Leong, K. F., & Lim, C. S. (2010). *Rapid prototyping: principles and applications*. World scientific.

CİRİT, O. S., MÜDERRİS, T., MIZRAKLI, A. U., VURUPALMAZ, Y., & BARIŞ, A. (2014). *Aerobic Bacteria Isolated from the Wound Cultures and Their Antibiotic Susceptibilities*.

Correa-González, Y. X., Rojas-Cardozo, M. A., & Mora-Huertas, C. E. (2019). Potentialities of the Colombian propolis in pharmaceutics and cosmetics: A standpoint from the quality control. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, *48*(3), 762–788.

CORRÊA, C. B., JAGUER, A., PADILHA, Ff., CARDOSO, J. C., SOUTO, E., SEVERINO, P., & Articles, O. (2020). Antibacterial activity of chitosan/collagen membranes containing red propolis extract. *Pharmazie*, *75*(2012), 75–81. https://doi.org/19.1691/ph.2020.9050

Costa, E. M., Silva, S., Tavaria, F. K., & Pintado, M. M. (2017). Insights into chitosan antibiofilm activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology*, *122*(6), 1547–1557.

Cullen, B., Smith, R., Mcculloch, E., Silcock, D., & Morrison, L. (2002). Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, *10*(1), 16–25. https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2002.10703.x

Cunha, I., Sawaya, A. C. H. F., Caetano, F. M., Shimizu, M. T., Marcucci, M. C., Drezza, F. T., Povia, G. S., & Carvalho, P. de O. (2004). Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *15*, 964–970.

da Conceição, M. F. (n.d.). *INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 12 DE JANEIRO DE 2010*.

da Cunha, M. C., Passos, F. R., Mendes, F. Q., da Silva, S. A., de Almeida, W. L., & Nasser, V. G. (2017). Extrato de própolis na conservação pós-colheita de maracujá-amarelo. *Interciencia*, *42*(5), 320–323.

da Rosa, C., Bueno, I. L., Quaresma, A. C. M., & Longato, G. B. (2022). Healing potential of propolis in skin wounds evidenced by clinical studies. *Pharmaceuticals*, *15*(9), 1143.

da Silva, J. F. M., de Souza, M. C., Matta, S. R., de Andrade, M. R., & Vidal, F. V. N. (2006). Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, *99*(3), 431–435.

Daiuto, É. R., Minarelli, P. H., Vieites, R. L., & Orsi, R. de O. (2012). *Propolis and vegetable wax in the conservation of Hass avocado.*

De Carli, C., Aylanc, V., Mouffok, K. M., Santamaria-Echart, A., Barreiro, F., Tomás, A., Pereira, C., Rodrigues, P., Vilas-Boas, M., & Falcão, S. I. (2022). Production of chitosan-based biodegradable active films using bio-waste enriched with polyphenol propolis extract envisaging food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *213*, 486–497.

Demirci, U., & Montesano, G. (2007). Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets. *Lab on a Chip*, *7*(9), 1139–1145.

Demirtaş, T. T., Irmak, G., & Gümüşderelioğlu, M. (2017). A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *Biofabrication*, *9*(3), 35003.

Dezmirean, D. S., Paşca, C., Moise, A. R., & Bobiş, O. (2020). Plant sources responsible for the chemical composition and main bioactive properties of poplar-type propolis. *Plants*, *10*(1), 22.

Diegelmann, R. F., & Evans, M. C. (2004). Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, *9*(December), 283–289. https://doi.org/10.2741/1184

Dragland, I. S., Rukke, H. V., Stenhagen, I. S. R., Lönn-Stensrud, J., & Kopperud, H. M. (2016). Antibacterial and antibiofilm effect of low viscosity chitosan against Staphylococcus epidermidis. *International Journal of Microbiology*, *2016*(1), 9159761.

Driskell, R. R., Lichtenberger, B. M., Hoste, E., Kretzschmar, K., Simons, B. D., Charalambous, M., Ferron, S. R., Herault, Y., Pavlovic, G., Ferguson-Smith, A. C., & Watt, F. M. (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, *504*(7479), 277–281. https://doi.org/10.1038/nature12783

Duca, L., Floquet, N., Alix, A. J. P., Haye, B., & Debelle, L. (2004). Elastin as a matrikine. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *49*(3), 235–244. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.09.007

El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Bankova, V., Popova, M., Neto, L., Faleiro, M. L., & Miguel, M. da G. (2018). Moroccan propolis: a natural antioxidant, antibacterial, and antibiofilm against Staphylococcus aureus with no induction of resistance after continuous exposure. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2018*(1), 9759240.

El-Hady, N. A. A. A., ElSayed, A. I., El-Saadany, S. S., Deligios, P. A., & Ledda, L. (2021). Exogenous application of foliar salicylic acid and propolis enhances antioxidant defenses and growth parameters in tomato plants. *Plants*, *10*(1), 74.

El-Kersh, D. M., Abou El-Ezz, R. F., Ramadan, E., & El-Kased, R. F. (2024). In vitro and in vivo burn healing study of standardized propolis: Unveiling its antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory actions in relation to its phytochemical profiling. *Plos One*, *19*(5), e0302795.

El-Sakhawy, M., Salama, A., & Tohamy, H.-A. S. (2023). Applications of propolis-based materials in wound healing. *Archives of Dermatological Research*, *316*(1), 61.

El Sohaimy, S., & Masry, S. (2014). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian and Chinese propolis. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, *14*, 1116–1124.

Escárcega-Galaz, A. A., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Sanches-Silva, A., Madera-Santana, T. J., & Paseiro-Losada, P. (2018). Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based

films as antimicrobial dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, *116*, 472–481. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.149

Escriche, I., & Juan-Borrás, M. (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, *106*, 834–841.

Fabris, S., Bertelle, M., Astafyeva, O., Gregoris, E., Zangrando, R., Gambaro, A., Lima, G. P. P., & Stevanato, R. (2013). Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. *Pharmacology & Pharmacy*, *4*, 46–51.

Falcão, S. I., Tomás, A., Vale, N., Gomes, P., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic quantification and botanical origin of Portuguese propolis. *Industrial Crops and Products*, *49*, 805–812.

Falcão, S. I., Vale, N., Cos, P., Gomes, P., Freire, C., Maes, L., & Vilas-Boas, M. (2014). In vitro evaluation of portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity. *Phytotherapy Research*, *28*(3), 437–443. https://doi.org/10.1002/ptr.5013

Falcão, S. I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M. R. M., Freire, C., Cardoso, S. M., & Vilas-Boas, M. (2013). Phenolic Profiling of Portuguese Propolis by LC–MS Spectrometry: Uncommon Propolis Rich in Flavonoid Glycosides. *Phytochemical Analysis*, *24*(4), 309–318. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pca.2412

Fang, Y., Frampton, J. P., Raghavan, S., Sabahi-Kaviani, R., Luker, G., Deng, C. X., & Takayama, S. (2012). Rapid generation of multiplexed cell cocultures using acoustic droplet ejection followed by aqueous two-phase exclusion patterning. *Tissue Engineering Part C: Methods*, *18*(9), 647–657.

Fang, Y., Guo, Y., Liu, T., Xu, R., Mao, S., Mo, X., Zhang, T., Ouyang, L., Xiong, Z., & Sun, W. (2022). Advances in 3D Bioprinting. *Chinese Journal of Mechanical Engineering: Additive Manufacturing Frontiers*, *1*(1), 100011. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cjmeam.2022.100011

Farida, S., Pratami, D. K., Sahlan, M., Mun'im, A., Djamil, R., Winarti, W., Ayub, R., Alahmadi, T. A., Rahmawati, S. I., & Putra, M. Y. (2023). In vitro study on antidiabetic and antihypertensive activities of ethanolic extract of propolis of Indonesian stingless bee Tetragonula sapiens. *Journal of King Saud University-Science*, *35*(6), 102738.

Farooqui, T., & A Farooqui, A. (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Current Nutrition & Food Science*, *6*(3), 186–199.

Fatimi, A., Okoro, O. V., Podstawczyk, D., Siminska-Stanny, J., & Shavandi, A. (2022). Natural hydrogel-based bio-inks for 3D bioprinting in tissue engineering: a review. *Gels*, *8*(3), 179.

Feás, X., & Estevinho, M. L. (2011). A survey of the in vitro antifungal activity of heather (Erica sp.) organic honey. *Journal of Medicinal Food*, *14*(10), 1284–1288.

Fedorovich, N. E., Alblas, J., de Wijn, J. R., Hennink, W. E., Verbout, A. J., & Dhert, W. J. A. (2007). Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Engineering*, *13*(8), 1905–1925.

Feingold, K. R., Schmuth, M., & Elias, P. M. (2007). The regulation of permeability barrier homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*, *127*(7), 1574–1576. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700774

Franca, J. R., De Luca, M. P., Ribeiro, T. G., Castilho, R. O., Moreira, A. N., Santos, V. R., & Faraco, A. A. G. (2014). Propolis-based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*, 1–11.

Franchin, M., Colón, D. F., da Cunha, M. G., Castanheira, F. V. S., Saraiva, A. L. L., Bueno-Silva, B., Alencar, S. M., Cunha, T. M., & Rosalen, P. L. (2016). Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL-6. *Scientific Reports*, *6*(1), 36401.

Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. G. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, *242*(1), 27–33.

Freitas, A. S., Costa, M., Pontes, O., Seidel, V., Proença, F., Cardoso, S. M., Oliveira, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2022). Selective Cytotoxicity of Portuguese Propolis Ethyl Acetate Fraction towards Renal Cancer Cells. *Molecules*, *27*(13), 1–13. https://doi.org/10.3390/molecules27134001

Freitas, A. S., Cunha, A., Cardoso, S. M., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2019a). Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years. *Food Research International*, *119*, 622–633.

Freitas, A. S., Cunha, A., Cardoso, S. M., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2019b). Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years. *Food Research International*, *119*(July 2018), 622–633. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.040

Freitas, A. S., Cunha, A., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2022). Propolis antibacterial and antioxidant synergisms with gentamicin and honey. *Journal of Applied Microbiology*, *132*(4), 2733–2745.

Freitas, A. S., Cunha, A., Parpot, P., Cardoso, S. M., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2022). Propolis efficacy: The quest for eco-friendly solvents. *Molecules*, *27*(21), 7531.

Freitas, A. S., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2024). Further Insights on Honey and Propolis from Gerês (Portugal) and Their Bioactivities: Unraveling the Impact of Beehive Relocation. *Life*, *14*(4), 506.

Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., & Nirgude, P. S. (2015). Lyophilization/freeze drying–a review. *World J. Pharm. Res*, *4*(8), 516–543.

Gardan, J. (2017). Additive manufacturing technologies: state of the art and trends. *Additive Manufacturing Handbook*, 149–168.

Gensch, L., Jantke, K., Rasche, L., & Schneider, U. A. (2024). Pesticide risk assessment in European agriculture: Distribution patterns, ban-substitution effects and regulatory implications. *Environmental Pollution*, *348*, 123836.

Germini, G., & Peltonen, L. (2021). 3D printing of drug nanocrystals for film formulations. *Molecules*, *26*(13), 3941.

Geyik, F., Kaya, S., Yılmaz, D. E., Demirci, H., Akmayan, I., Özbek, T., & Acar, S. (2024). Propolis-Loaded Poly (lactic-co-glycolic Acid) Nanofibers: An In Vitro Study. *ACS Omega*, *9*(12), 14054–14062.

Gharib, A. A., & Taha, M. (2013). Antimicrobial activity of propolis against some bacteria and fungi. *Zagazig Veterinary Journal*, *41*(1), 81–97.

Ghoreishi, M. (2000). Heat shock proteins in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. Journal of medical and dental sciences, 47(2), 143-150..pdf. (n.d.).

Gibson, I., Rosen, D., Stucker, B., Khorasani, M., Gibson, I., Rosen, D., Stucker, B., & Khorasani, M. (2021). Development of additive manufacturing technology. *Additive Manufacturing Technologies*, 23–51.

Gibson, I., Rosen, D. W., Stucker, B., Khorasani, M., Rosen, D., Stucker, B., & Khorasani, M. (2021). *Additive manufacturing technologies* (Vol. 17). Springer.

Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. In *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X

Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W. M., Scott, J. H. J., Joy, D. C., Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., & Ritchie, N. W. M. (2018). Scanning electron microscope (SEM) instrumentation. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, 65–91.

Golebiewska, E. M., & Poole, A. W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Reviews*, *29*(3), 153–162. https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.10.003

Gomes, T., Feás, X., Iglesias, A., & Estevinho, L. M. (2011). Study of organic honey from the northeast of Portugal. *Molecules*, *16*(7), 5374–5386.

Gouvinhas, I., Machado, J., Gomes, S., Lopes, J., Martins-Lopes, P., & Barros, A. I. (2014). Phenolic composition and antioxidant activity of monovarietal and commercial Portuguese olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *91*, 1197–1203.

Groeber, F., Holeiter, M., Hampel, M., Hinderer, S., & Schenke-Layland, K. (2011). Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *63*(4), 352–366. https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.005

Guan, M., Xia, P., Tian, M., Chen, D., & Zhang, X. (2020). Molecular fingerprints of conazoles via functional genomic profiling of Saccharomyces cerevisiae. *Toxicology in Vitro*, *69*, 104998.

Gungor-Ozkerim, P. S., Inci, I., Zhang, Y. S., Khademhosseini, A., & Dokmeci, M. R. (2018). Bioinks for 3D bioprinting: an overview. *Biomaterials Science*, *6*(5), 915–946.

Guo, N., & Leu, M. C. (2013). Additive manufacturing: technology, applications and research needs. *Frontiers of Mechanical Engineering*, *8*, 215–243.

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, *453*(7193), 314–321. https://doi.org/10.1038/nature07039

Halliwell, B. (2024). Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *25*(1), 13–33.

Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, *34*(3), 599–610. https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y

Hanft, J. R., & Surprenant, M. S. (2002). Healing of chronic foot ulcers in diabetic patients treated with a human fibroblast-derived dermis. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, *41*(5), 291–299. https://doi.org/10.1016/S1067-2516(02)80047-3

Hanson, C. W., & Martin, W. J. (1978). Modified agar dilution method for rapid antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *13*(3), 383–388. https://doi.org/10.1128/AAC.13.3.383

Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., & Okuda, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, *32*(2), 685–691.

He, P., Zhao, J., Zhang, J., Li, B., Gou, Z., Gou, M., & Li, X. (2018). Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burns & Trauma*, *6*.

He, Z., Hu, C.-P., Chen, H., Chen, X., Lim, S. K. J., Hu, J., & Hu, X. (2023). Direct ink writing of geopolymer-based membranes with anisotropic structures for water treatment. *Journal of Membrane Science*, *685*, 121953.

Healy, K., Hutmacher, D. W., Grainger, D. W., & James Kirkpatrick, C. (2017). *Comprehensive biomaterials II*. Elsevier.

Hegazi, A. G., Abd El Hady, F. K., & Abd Allah, F. A. M. (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *55*(1–2), 70–75.

HEIMBACH, N. da S., ÍTAVO, C. C. B. F., LEAL, C. R. B., ÍTAVO, L. C. V., SILVA, J. A. da, SILVA, P. C. G., REZENDE, L. C. de, & GOMES, M. de F. F. (2016). Resíduo da extração de própolis como inibidor bacteriano in vitro. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, *17*, 65–72.

Hemshekhar, M., Anaparti, V., & Mookherjee, N. (2016). Functions of cationic host defense peptides in immunity. *Pharmaceuticals*, *9*(3), 40.

Hidaka, M., Kojima, M., Nakahata, M., & Sakai, S. (2021). Visible light-curable chitosan ink for extrusion-based and vat polymerization-based 3D bioprintings. *Polymers*, *13*(9), 1382. https://doi.org/10.3390/polym13091382

Hiemstra, P. S., Maassen, R. J., Stolk, J., Heinzel-Wieland, R., Steffens, G. J., & Dijkman, J. H. (1996). Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infection and Immunity*, *64*(11), 4520–4524.

Hogendoorn, E. A., Sommeijer, M. J., & Vredenbregt, M. J. (2013). Alternative method for measuring beeswax content in propolis from the Netherlands. *Journal of Apicultural Science*, *57*(2), 81–90. https://doi.org/10.2478/jas-2013-0019

Honey for wound healing – unit plan. (2024). https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1722-honey-for-wound-healing-unit-plan

Huang, J., Lei, X., Huang, Z., Rong, Z., Li, H., Xie, Y., Duan, L., Xiong, J., Wang, D., & Zhu, S. (2022). Bioprinted gelatin-recombinant type III collagen hydrogel promotes wound healing. *International Journal of Bioprinting*, *8*(2).

Hunter, H. N., Fulton, D. B., Ganz, T., & Vogel, H. J. (2002). The solution structure of human hepcidin, a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake and hereditary hemochromatosis* 210. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(40), 37597–37603.

Ibrahim, H. I. M., Thangavelu, M., & Khalifa, A. (2022). Honey-Propolis-Engineered Collagen Peptides as Promising Wound-Healing Matrix in Mouse Model. *Molecules*, *27*(20), 1–16. https://doi.org/10.3390/molecules27207090

Ichi, I., Hori, H., Takashima, Y., Adachi, N., Kataoka, R., Okihara, K., Hashimoto, K., & Kojo, S. (2009). The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *Journal of Food Science*, *74*(5), H127–H131.

Islam, S., Hussain, E. A., Shujaat, S., Khan, M. U., Ali, Q., Malook, S. U., & Ali, D. (2024). Antibacterial potential of Propolis: molecular docking, simulation and toxicity analysis. *AMB Express*, *14*(1), 81.

Iturriaga, L., Olabarrieta, I., Castellan, A., Gardrat, C., & Coma, V. (2014). Active naringin-chitosan films: Impact of UV irradiation. *Carbohydrate Polymers*, *110*, 374–381.

Iyyam Pillai, S., Palsamy, P., Subramanian, S., & Kandaswamy, M. (2010). Wound healing properties of Indian propolis studied on excision wound-induced rats. *Pharmaceutical Biology*, *48*(11), 1198–1206.

Jacob, A., Parolia, A., Pau, A., & Davamani Amalraj, F. (2015). The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *15*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s12906-015-0814-1

Jadhav, A., & Jadhav, V. S. (2022). A review on 3D printing: An additive manufacturing technology. *Materials Today: Proceedings*, *62*, 2094–2099.

Jadhav, T. R., & Moon, R. S. (2015). Review on lyophilization technique. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *4*(5), 1906–1928.

Jaski, J. M., Franzener, G., Moura, G. S., Scheffer, D. C., & Telaxka, F. J. (2015). Atividade Antimicrobiana de Extrato Etanólico de Própolis Verde sobre Fitobactérias do Feijoeiro. *SEPE-Seminário de Ensino, Pesquisa e Extensão Da UFFS*, *5*.

Jasveer, S., & Jianbin, X. (2018). Comparison of different types of 3D printing technologies. *International Journal of Scientific and Research Publications*, *8*(4), 1–9.

Jones, V., Grey, J. E., & Harding, K. G. (2006). ABC of wound healing: Wound dressings. *British Medical Journal*, *332*(7544), 777–780.

Kalaycıoğlu, Z., Torlak, E., Akın-Evingür, G., Özen, İ., & Erim, F. B. (2017). Antimicrobial and physical properties of chitosan films incorporated with turmeric extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, *101*, 882–888.

Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., & Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, *116*(2), 452–461.

Kapare, H. S., Giram, P. S., Raut, S. S., Gaikwad, H. K., & Paiva-Santos, A. C. (2023). Formulation Development and Evaluation of Indian Propolis Hydrogel for Wound Healing. *Gels*, *9*(5), 1–19. https://doi.org/10.3390/gels9050375

Kasote, D., Bankova, V., & Viljoen, A. M. (2022). Propolis: Chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochemistry Reviews*, *21*(6), 1887–1911. https://doi.org/10.1007/s11101-022-09816-1

Kasper, J. C., Winter, G., & Friess, W. (2013). Recent advances and further challenges in lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *85*(2), 162–169.

Khan, S. (2023). *Antimicrobial Resistance in Environment and Antimicrobial Stewardship*.

Khodabakhshi, D., Eskandarinia, A., Kefayat, A., Rafienia, M., Navid, S., Karbasi, S., & Moshtaghian, J. (2019). In vitro and in vivo performance of a propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *178*, 177–184.

Khoeini, R., Nosrati, H., Akbarzadeh, A., Eftekhari, A., Kavetskyy, T., Khalilov, R., Ahmadian, E., Nasibova, A., Datta, P., & Roshangar, L. (2021). Natural and synthetic bioinks for 3D bioprinting. *Advanced NanoBiomed Research*, *1*(8), 2000097.

Kingsley, K., Huff, J. L., Rust, W. L., Carroll, K., Martinez, A. M., Fitchmun, M., & Plopper, G. E. (2002).

ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *293*(3), 1000–1006. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00331-5

Kirsner, R. S. (2005). Normal cutaneous wound healing: Clinical correlation with cellular and molecular events - Commentary. *Dermatologic Surgery*, *31*(6), 686.

Kishore, U. (2021). *Microbial Pathogenesis*. Springer.

Kitamura, H. (2019). Effects of propolis extract and propolis-derived compounds on obesity and diabetes: knowledge from cellular and animal models. *Molecules*, *24*(23), 4394.

Koga, A. Y., Pereira, A. V, Lipinski, L. C., & Oliveira, M. R. P. (2018). Evaluation of wound healing effect of alginate films containin g Aloe vera (Aloe barbadensis Miller) gel. *Journal of Biomaterials Applications*, *32*(9), 1212–1221.

Komi, D. E. A., Khomtchouk, K., & Santa Maria, P. L. (2020). A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *58*(3), 298–312. https://doi.org/10.1007/s12016-019-08729-w

Kottner, J., Beeckman, D., Vogt, A., & Blume-Peytavi, U. (2019). Skin health and integrity. In *Innovations and Emerging Technologies in Wound Care*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815028-3.00011-0

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, *64*(3), 235–240.

Kumar-Krishnan, S., Prokhorov, E., Ramírez, M., Hernandez-Landaverde, M. A., Zarate-Triviño, D. G., Kovalenko, Y., Sanchez, I. C., Méndez-Nonell, J., & Luna-Bárcenas, G. (2014). Novel gigahertz frequency dielectric relaxations in chitosan films. *Soft Matter*, *10*(43), 8673–8684.

Kumar, S., Ye, F., Dobretsov, S., & Dutta, J. (2019). Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. *Applied Sciences*, *9*(12), 2409.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, *84*(3), 329–339.

Leal, A. L. A. B. (2019). Comparative Review of Main Methods for Antimicrobial Tests. *Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *7*.

Lee, S. H., Jeong, S. K., & Ahn, S. K. (2006). An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Medical Journal*, *47*(3), 293–306. https://doi.org/10.3349/ymj.2006.47.3.293

Li, J., Chen, J., & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, *25*(1), 9–18. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007

Li, P., & Guo, X. (2018). A review: Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. *Stem Cell Research and Therapy*, *9*(1), 1–7. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1044-5

Li, X., Wang, X., Du, J., Bu, X., Peng, C., Duan, X., & Fu, C. (2024). Applications of β-defensins against infectious pathogenic microorganisms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 1–10.

Lin, Q., Fang, D., Fang, J., Ren, X., Yang, X., Wen, F., & Su, S. B. (2011). Impaired Wound Healing with

Defective Expression of Chemokines and Recruitment of Myeloid Cells in TLR3-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, *186*(6), 3710–3717. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003007

Lippert, U., Artuc, M., Grützkau, A., Babina, M., Guhl, S., Haase, I., Blaschke, V., Zachmann, K., Knosalla, M., Middel, P., Krüger-Krasagakis, S., & Henz, B. M. (2004). Human skin mast cells express H2 and H4, but not H3 receptors. *Journal of Investigative Dermatology*, *123*(1), 116–123. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22721.x

Lipsky, B. A., Dryden, M., Gottrup, F., Nathwani, D., Seaton, R. A., & Stryja, J. (2016). Antimicrobial stewardship in wound care: a position paper from the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and European Wound Management Association. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(11), 3026–3035.

Liu, F., Chen, Q., Liu, C., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., Tong, H., & Wang, X. (2018). Natural polymers for organ 3D bioprinting. *Polymers*, *10*(11), 1278.

Liu, Y., Chen, J., Li, P., & Ning, N. (2021). The effect of chitosan in wound healing: a systematic review. *Advances in Skin & Wound Care*, *34*(5), 262–266.

Liu, Y., Li, S., Sun, Y., Li, Y., Jiang, C., & Hu, Q. (2017). Bioprinted chitosan and hydroxyapatite micro-channels structures scaffold for vascularization of bone regeneration. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, *7*(1), 28–34.

Lopes, M., Nunes, L. F., Falcão, S. I., & ... (2017). Harmonization of standard procedures for propolis analysis. *Revista de Ciências ...*, *40*, 208–215. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20183382514

Lopes, M., Nunes, L., Falcão, S., & Vilas-Boas, M. (2017). Harmonização de metodologias de análise da própolis. *Revista de Ciências Agrárias*, *40*, 208–2015.

López-Mata, M. A., Ruiz-Cruz, S., de Jesús Ornelas-Paz, J., Del Toro-Sánchez, C. L., Márquez-Ríos, E., Silva-Beltrán, N. P., Cira-Chávez, L. A., & Burruel-Ibarra, S. E. (2018). Mechanical, barrier and antioxidant properties of chitosan films incorporating cinnamaldehyde. *Journal of Polymers and the Environment*, *26*, 452–461.

LOUREIRO, E. M., GALBIATI, C., FRANZ, G. M., & MENDONÇA, J. C. (2014). Atividade antimicrobiana do mel e da própolis produzida por Apis melífera em apiários comerciais em Mato Grosso. *CONBRAPI, Belém-PA*.

M. Afonso, A., Gonçalves, J., Luís, Â., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2020). Evaluation of the in vitro wound-healing activity and phytochemical characterization of propolis and honey. *Applied Sciences*, *10*(5), 1845.

Machorowska-Pieniążek, A., Morawiec, T., Mertas, A., Tanasiewicz, M., Dziedzic, A., & Król, W. (2013). Influence of propolis on hygiene, gingival condition, and oral microflora in patients with cleft lip and palate treated with fixed orthodontic appliances. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*(1), 183915.

Machorowska-Pieniążek, A., Morawiec, T., Olek, M., Mertas, A., Aebisher, D., Bartusik-Aebisher, D., Cieślar, G., & Kawczyk-Krupka, A. (2021). Advantages of using toothpaste containing propolis and plant oils for gingivitis prevention and oral cavity hygiene in cleft lip/palate patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *142*, 111992.

Madian, N. G., El-Ashmanty, B. A., & Abdel-Rahim, H. K. (2023). Improvement of Chitosan Films

Properties by Blending with Cellulose, Honey and Curcumin. *Polymers*, *15*(12), 2587.

Mahmodi, G., Zarrintaj, P., Taghizadeh, A., Taghizadeh, M., Manouchehri, S., Dangwal, S., Ronte, A., Ganjali, M. R., Ramsey, J. D., & Kim, S.-J. (2020). From microporous to mesoporous mineral frameworks: An alliance between zeolite and chitosan. *Carbohydrate Research*, *489*, 107930.

Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2018). Preparation and characterization of gelatin-chitosan-nanoβ-TCP based scaffold for orthopaedic application. *Materials Science and Engineering: C*, *86*, 83–94.

Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J. A., Groll, J., & Hutmacher, D. W. (2013). 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. *Advanced Materials*, *25*(36), 5011–5028.

Malik, Z. J., Al-ameedi, A. I., Ayad, Z. M., & Abdullah, M. (2021). A comparative study between the effect of synthetic and natural propolis on rabbits skin wound infected by staphylococcus aureus. *Adv. Anim. Vet. Sci*, *9*(8), 1233–1237.

Mansfield, B., Werner, M., Berndt, C., Shattuck, A., Galt, R., Williams, B., Argüelles, L., Barri, F. R., Ishii, M., & Kunin, J. (2024). A new critical social science research agenda on pesticides. *Agriculture and Human Values*, *41*(2), 395–412.

Marquele-Oliveira, F., da Silva Barud, H., Torres, E. C., Machado, R. T. A., Caetano, G. F., Leite, M. N., Frade, M. A. C., Ribeiro, S. J. L., & Berretta, A. A. (2019). Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, *136*, 570–578. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.135

MARSTON, W., HANFT, J., NORWOOD, P., & POLLAK, R. (2003). The Efficacy and Safety of Dermagraft in. *Diabetes Care*, *26*(6), 1701–1705.

Matei, P. M., Martín-Ramos, P., Sánchez-Báscones, M., Hernández-Navarro, S., Correa-Guimaraes, A., Navas-Gracia, L. M., Rufino, C. A., Ramos-Sánchez, M. C., & Martín-Gil, J. (2015). Synthesis of chitosan oligomers/propolis/silver nanoparticles composite systems and study of their activity against Diplodia seriata. *International Journal of Polymer Science*, *2015*(1), 864729.

Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., & Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(5), 2185–2192.

Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., & Sen, C. K. (2021). Collagen in wound healing. *Bioengineering*, *8*(5), 63.

Mauricio-Sánchez, R. A., Salazar, R., Luna-Bárcenas, J. G., & Mendoza-Galván, A. (2018). FTIR spectroscopy studies on the spontaneous neutralization of chitosan acetate films by moisture conditioning. *Vibrational Spectroscopy*, *94*, 1–6.

Mcphee, J. B., & Hancock, R. E. W. (2005). Function and therapeutic potential of host defence peptides. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, *11*(11), 677–687.

Mello, B. C. B. S., & Hubinger, M. D. (2012). Antioxidant activity and polyphenol contents in B razilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different p H values. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*(12), 2510–2518.

Melo, J. G. A. de, Soares, D. M., & Santos, S. C. dos. (2024). In-vitro antibacterial activity of propolis extract against periodontopathogenic bacteria: a systematic review. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*, *65*, 3–14.

Mendonca-Melo, L., Mota, E., Lopez, B., Sawaya, A., Freitas, L., Jain, S., Batista, M., & Araujo, E. (2017). Chemical and genetic similarity between Dalbergia ecastaphyllum and red propolis from the Northeastern Brazil. *Journal of Apicultural Research*, *56*(1), 32–39.

Mengesha, R. E., Kasa, B. G.-S., Saravanan, M., Berhe, D. F., & Wasihun, A. G. (2014). Aerobic bacteria in post surgical wound infections and pattern of their antimicrobial susceptibility in Ayder Teaching and Referral Hospital, Mekelle, Ethiopia. *BMC Research Notes*, *7*, 1–6.

Mestre, D. S. G. (2014). *Aplicação de filmes de suberina na produção de materiais bio-funcionais*. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.

Mezdari, F., & Khirouni, K. (2022). Structural, Optical, and Electrical Characterization of Biological and Bioactive Propolis Films. *ACS Omega*, *7*(47), 43055–43067.

Miguel, M. G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., & Antunes, M. D. (2010). Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, *48*(12), 3418–3423.

Milena P. Popovaa Vassya S, B., Stefan, B., Iva, T., Christo, N., Gian Luigi, M., & Anna-Gloria, S. (2007). Original article Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, *38*, 306–311.

Miorin, P. L., Levy Junior, N. C., Custodio, A. R., Bretz, W. A., & Marcucci, M. C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from Apis mellifera and Tetragonisca angustula against Staphylococcus aureus. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(5), 913–920.

Mohammed, O., Dawod, A., Mirghani, A., Alkarsani, M., Dafalla, A., Mohammed, T. S. E., & Taha, S. (2022). Frequency of Isolation and Antibiotic Resistance Patterns of Bacterial Isolates from Wound Infections, National Cancer Institute, Wad-Medani, Sudan, 2021: Frequency of Isolation and Antibiotic Resistance Patterns of Bacterial Isolates from Wound Infection. *Iraqi National Journal of Medicine*, *4*(1), 110–117.

Monroy, Y. M., Rodrigues, R. A. F., Rodrigues, M. V. N., Sant'Ana, A. S., Silva, B. S., & Cabral, F. A. (2017). Brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes at high pressure with supercritical carbon dioxide, ethanol and water. *The Journal of Supercritical Fluids*, *130*, 189–197. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.006

Monteiro Lobato, G. M. (2019). *Estudo da gelificação do produto de digestão de ECM descelularizada para uso em engenharia de tecidos*. Universidade de São Paulo.

Morawiec, T., Dziedzic, A., Niedzielska, I., Mertas, A., Tanasiewicz, M., Skaba, D., Kasperski, J., Machorowska-Pieniążek, A., Kucharzewski, M., & Szaniawska, K. (2013). The biological activity of propolis-containing toothpaste on oral health environment in patients who underwent implant-supported prosthodontic rehabilitation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*(1), 704947.

Moreira, C. D. F., Carvalho, S. M., Florentino, R. M., França, A., Okano, B. S., Rezende, C. M. F., Mansur, H. S., & Pereira, M. M. (2019). Injectable chitosan/gelatin/bioactive glass nanocomposite hydrogels for potential bone regeneration: in vitro and in vivo analyses. *International Journal of Biological*

Macromolecules, *132*, 811–821.

Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., & Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(11), 3482–3485.

Morganti, P., Del Ciotto, P., Carezzi, F., Nunziata, M. L., & Morganti, G. (2016). A chitin nanofibril-based non-woven tissue as medical dressing: the role of bionanotechnology. *Nanomaterials and Regenerative Medicine*, *February*, 123–142. https://doi.org/10.5599/obp.9.25

Morris, V. B., Nimbalkar, S., Younesi, M., McClellan, P., & Akkus, O. (2017). Mechanical properties, cytocompatibility and manufacturability of chitosan: PEGDA hybrid-gel scaffolds by stereolithography. *Annals of Biomedical Engineering*, *45*, 286–296.

Moț, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R., & Sârbu, C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV–vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(4–5), 516–522.

Murakami, K., Aoki, H., Nakamura, S., Nakamura, S. ichiro, Takikawa, M., Hanzawa, M., Kishimoto, S., Hattori, H., Tanaka, Y., Kiyosawa, T., Sato, Y., & Ishihara, M. (2010). Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, *31*(1), 83–90. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.031

Nagahama, H., Maeda, H., Kashiki, T., Jayakumar, R., Furuike, T., & Tamura, H. (2009). Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, *76*(2), 255–260.

Negut, I., Dorcioman, G., & Grumezescu, V. (2020). *Sca ff olds for Wound Healing Applications*.

Nichitoi, M. M., Josceanu, A. M., Isopescu, R. D., Isopencu, G. O., Geana, E.-I., Ciucure, C. T., & Lavric, V. (2021). Polyphenolics profile effects upon the antioxidant and antimicrobial activity of propolis extracts. *Scientific Reports*, *11*(1), 20113.

Norman, J. (2021). Chuck Hull invents stereolithography or 3D printing and produces the first commercial 3D printer. History of Information. *Haettu*, *14*, 2021.

Ntousia, M., & Fudos, I. (2019). 3D printing technologies & applications: an overview. *Proceedings of the CAD 2020 Conference, Singapore*, *243*, 248.

Odde, D. J., & Renn, M. J. (2000). Laser-guided direct writing of living cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *67*(3), 312–318.

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, *122*(1), 161–166.

Oliveira, A. V., Ferreira, A. L., Nunes, S., Dandlen, S. A., Miguel, M. da G., & Faleiro, M. L. (2017). Antibacterial activity of propolis extracts from the south of Portugal. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *30*(1).

Oliveira, R. N., Mancini, M. C., Oliveira, F. C. S. de, Passos, T. M., Quilty, B., Thiré, R. M. da S. M., & McGuinness, G. B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria (Rio de Janeiro)*, *21*(03), 767–779.

Oryan, A., Alemzadeh, E., & Moshiri, A. (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *98*, 469–483.

Osman, Z., & Arof, A. K. (2003). FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, *48*(8), 993–999.

Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of Candida. *Mycoses*, *44*(9-10), 375–378.

Ouidad, A., Sara, C., & Samir, D. (2020). Biological properties and Acute Toxicity Study of Copper oxide nanoparticles prepared by aqueous leaves extract of Portulaca oleracea (L). *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, *10*(2), 89–94.

Our Story | 3D Systems. (2009). In *3D Systems*. https://www.3dsystems.com/our-story

Ousey, K., Stephenson, J., Barrett, S., King, B., Morton, N., Fenwick, K., & Carr, C. (2013). Wound care in five English NHS Trusts: Results of a survey. *Wounds UK*, *9*(4), 20–28.

Owens, C. D., & Stoessel, K. (2008). Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *Journal of Hospital Infection*, *70*, 3–10.

Pahlavani, N., Malekahmadi, M., Firouzi, S., Rostami, D., Sedaghat, A., Moghaddam, A. B., Ferns, G. A., Navashenaq, J. G., Reazvani, R., & Safarian, M. (2020). Molecular and cellular mechanisms of the effects of Propolis in inflammation, oxidative stress and glycemic control in chronic diseases. *Nutrition & Metabolism*, *17*, 1–12.

Pamplona-Zomenhan, L. C., Pamplona, B. C., Silva, C. B. da, Marcucci, M. C., & Mimica, L. M. J. (2011). Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of an ethanol extract of Brazilian classified propolis on strains of Staphylococcus aureus. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*, 1259–1264.

Parihar, A., Parihar, M. S., Milner, S., & Bhat, S. (2008). Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*, *34*(1), 6–17. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.04.009

Park, S. Y., Kim, J. H., Cho, S. I., Kim, K. Il, Cho, H. J., Park, C. W., Lee, C. H., & Kim, H. O. (2014). Induction of a hardening phenomenon and quantitative changes of ceramides in stratum corneum. *Annals of Dermatology*, *26*(1), 35–42. https://doi.org/10.5021/ad.2014.26.1.35

Paula, V. B., Estevinho, L. M., Cardoso, S. M., & Dias, L. G. (2023). Comparative Methods to Evaluate the Antioxidant Capacity of Propolis: An Attempt to Explain the Differences. *Molecules*, *28*(12), 4847.

Paviani, L. C., Fiorito, G., Sacoda, P., & Cabral, F. A. (2013). Different solvents for extraction of Brazilian green propolis: Composition and extraction yield of phenolic compounds. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluid*, 1–5.

Peixoto, M., Freitas, A. S., Cunha, A., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2021). Antioxidant and antimicrobial activity of blends of propolis samples collected in different years. *Lwt*, *145*, 111311.

Peixoto, M., Freitas, A. S., Cunha, A., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2022). Mixing Propolis from Different Apiaries and Harvesting Years: Towards Propolis Standardization? *Antibiotics*, *11*(9), 1–17. https://doi.org/10.3390/antibiotics11091181

Pereira, C. S., Araújo, A. G., Guimarães, R. J., & Paiva, L. C. (2001). Uso da própolis como inibidor da germinação de esporos de Hemileia vastatrix. *Mensagem Doce*, *3*, 45–49.

Pereira, C. S., Guimarães, R. J., Pozza, E. A., & da Silva, A. A. (2008). Controle da cercosporiose e da

ferrugem do cafeeiro com extrato etanólico de própolis. *Ceres*, *55*(5).

Pereira, R. F., & Bártolo, P. J. (2016). Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, *5*(5), 208–229. https://doi.org/10.1089/wound.2013.0506

Pérez-Nava, A., Reyes-Mercado, E., & González-Campos, J. B. (2022). Production of chitosan nanofibers using the HFIP/acetic acid mixture as electrospinning solvent. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, *173*(February). https://doi.org/10.1016/j.cep.2022.108849

Phonrachom, O., Charoensuk, P., Kiti, K., Saichana, N., Kakumyan, P., & Suwantong, O. (2023). Potential use of propolis-loaded quaternized chitosan/pectin hydrogel films as wound dressings: Preparation, characterization, antibacterial evaluation, and in vitro healing assay. *International Journal of Biological Macromolecules*, *241*, 124633.

Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, *15*(4), 235–240.

Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., & Sabatini, A.-G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, *38*(3), 306.

Prete, P. E. (1997). Growth effects of Phaenicia sericata larval extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sciences*, *60*(8), 505–510. https://doi.org/10.1016/S0024-3205(96)00688-1

Prete, S., Dattilo, M., Patitucci, F., Pezzi, G., Parisi, O. I., & Puoci, F. (2023). Natural and Synthetic Polymeric Biomaterials for Application in Wound Management. *Journal of Functional Biomaterials*, *14*(9). https://doi.org/10.3390/jfb14090455

Probst, I. S., Sforcin, J. M., VLM, R., Fernandes, A. A. H., & Fernandes Júnior, A. (2011). Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, *17*, 159–167.

Przybyłek, I., & Karpiński, T. M. (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules*, *24*(11), 2047.

Pu, Y., Jiang, H., Zhang, Y., Cao, J., & Jiang, W. (2023). Advances in propolis and propolis functionalized coatings and films for fruits and vegetables preservation. *Food Chemistry*, *414*, 135662.

Qiao, C., Ma, X., Wang, X., & Liu, L. (2021). Structure and properties of chitosan films: Effect of the type of solvent acid. *Lwt*, *135*, 109984.

Qu, J., Zhao, X., Liang, Y., Zhang, T., Ma, P. X., & Guo, B. (2018). Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. *Biomaterials*, *183*(August), 185–199. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.044

Rakhshaei, R., Namazi, H., Hamishehkar, H., Kafil, H. S., & Salehi, R. (2019). In situ synthesized chitosan–gelatin/ZnO nanocomposite scaffold with drug delivery properties: Higher antibacterial and lower cytotoxicity effects. *Journal of Applied Polymer Science*, *136*(22), 47590. https://doi.org/10.1002/app.47590

Ramanathan, G., Singaravelu, S., Muthukumar, T., Thyagarajan, S., Perumal, P. T., & Sivagnanam, U. T.

(2017). Design and characterization of 3D hybrid collagen matrixes as a dermal substitute in skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, *72*, 359–370. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.095

Ramanauskienė, K., Inkėnienė, A. M., Petrikaitė, V., & Briedis, V. (2013). Total phenolic content and antimicrobial activity of different lithuanian propolis solutions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*(1), 842985.

Ramasamy, P., & Shanmugam, A. (2015). Characterization and wound healing property of collagen–chitosan film from Sepia kobiensis (Hoyle, 1885). *International Journal of Biological Macromolecules*, *74*, 93–102.

Ramer, G., & Lendl, B. (2006). Attenuated Total Reflection F ourier Transform Infrared Spectroscopy. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*.

Ritthidej, G. C., Phaechamud, T., & Koizumi, T. (2002). Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films. *International Journal of Pharmaceutics*, *232*(1–2), 11–22.

Rocha, P. de S., Sampaio, L. R. L., Delmondes, G. de A., Saraiva, A. G. D., Perazzo, F. F., Fonseca, F. L. A., Souza, J. L. de, & Macedo, L. F. R. (2024). Effect of Brazilian green propolis in chronic ulcer treatment: a randomized clinical trial. *Revista Brasileira de Enfermagem*, *77*(4), e20230418.

Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound healing: A cellular perspective. *Physiological Reviews*, *99*(1), 665–706. https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017

Rodríguez-Núñez, J. R., Madera-Santana, T. J., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., & Soto Valdez, H. (2014). Chitosan/hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties. *Journal of Polymers and the Environment*, *22*, 41–51.

Rojczyk, E., Klama-Baryła, A., Łabuś, W., Wilemska-Kucharzewska, K., & Kucharzewski, M. (2020). Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. *Journal of Ethnopharmacology*, *262*, 113159.

Roseti, L., Cavallo, C., Desando, G., Parisi, V., Petretta, M., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2018). Three-dimensional bioprinting of cartilage by the use of stem cells: a strategy to improve regeneration. *Materials*, *11*(9), 1749.

Rutter, L. (2018). Identifying and managing wound infection in the community. *British Journal of Community Nursing*, *23*(Sup3), S6–S14.

Saadoon, S. M., Sergany, M. I., Mona, H. E. M., Reham, A. M. M., & Gad, S. B. (2022). The Efficiency of Using Some Natural Compounds for Management of Citrus Nematode Tylenchulus semipenetrans. *Arab Journal of Plant Protection*, *40*(4).

Saba, N., Jawaid, M., & Sultan, M. T. H. (2019). An overview of mechanical and physical testing of composite materials. *Mechanical and Physical Testing of Biocomposites, Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites*, 1–12.

Saeed, F., Ahmad, R. S., Arshad, M. U., Niaz, B., Batool, R., Naz, R., & Ansar Rasul Suleria, H. (2016). Propolis to curb lifestyle related disorders: An overview. *International Journal of Food Properties*, *19*(2), 420–437.

Sahranavard, M., Zamanian, A., Ghorbani, F., & Shahrezaee, M. H. (2020). A critical review on three dimensional-printed chitosan hydrogels for development of tissue engineering. *Bioprinting*, *17*,

e00063.

Salahuddin, B., Wang, S., Sangian, D., Aziz, S., & Gu, Q. (2021). Hybrid gelatin hydrogels in nanomedicine applications. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(4), 2886–2906. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01630

Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Product Reports*, *28*(5), 925–936.

Sani, M. A., Azizi-Lalabadi, M., Tavassoli, M., Mohammadi, K., & McClements, D. J. (2021). Recent advances in the development of smart and active biodegradable packaging materials. *Nanomaterials*, *11*(5), 1331.

Sato, T., Mello, D., Vasconcellos, L., Valente, A. J. M., & Borges, A. (2020). Chitosan-based coacervate polymers for propolis encapsulation: release and cytotoxicity studies. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 4561.

Sauri-Duch, E., Gutiérrez-Canul, C., Cuevas-Glory, L. F., Ramón-Canul, L., Pérez-Pacheco, E., & Moo-Huchin, V. M. (2021). Determination of quality characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of propolis from southeastern Mexico. *Journal of Apicultural Science*, *65*(1), 109–122.

Savencu, I., Iurian, S., Porfire, A., Bogdan, C., & Tomuţă, I. (2021). Review of advances in polymeric wound dressing films. *Reactive and Functional Polymers*, *168*, 105059.

Schaechter, M. (2009). *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press.

Schiele, N. R., Chrisey, D. B., & Corr, D. T. (2011). Gelatin-based laser direct-write technique for the precise spatial patterning of cells. *Tissue Engineering Part C: Methods*, *17*(3), 289–298.

Schiele, N. R., Corr, D. T., Huang, Y., Raof, N. A., Xie, Y., & Chrisey, D. B. (2010). Laser-based direct-write techniques for cell printing. *Biofabrication*, *2*(3), 32001.

Schilrreff, P., & Alexiev, U. (2022). Chronic inflammation in non-healing skin wounds and promising natural bioactive compounds treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4928.

Schreml, S., Szeimies, R. M., Prantl, L., Landthaler, M., & Babilas, P. (2010). Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *63*(5), 866–881. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.10.048

Schultz, G. S., & Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, *17*(2), 153–162. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x

Segueni, N., Boutaghane, N., Asma, S. T., Tas, N., Acaroz, U., Arslan-Acaroz, D., Shah, S. R. A., Abdellatieff, H. A., Akkal, S., & Peñalver, R. (2023). Review on Propolis Applications in Food Preservation and Active Packaging. *Plants*, *12*(8), 1654.

Segueni, N., Keskin, Ş., Kadour, B., Kolaylı, S., & Salah, A. (2021). Comparison between phenolic content, antioxidant, and antibacterial activity of Algerian and Turkish propolis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *24*(10), 1679–1687.

Seibert, J. B., Bautista-Silva, J. P., Amparo, T. R., Petit, A., Pervier, P., dos Santos Almeida, J. C., Azevedo, M. C., Silveira, B. M., Brandão, G. C., & de Souza, G. H. B. (2019). Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chemistry*, *287*, 61–67.

Seidel, V., Peyfoon, E., Watson, D. G., & Fearnley, J. (2008). Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy Research*, *22*(9), 1256–1263.

Sforcin, J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research*, *30*(6), 894–905. https://doi.org/10.1002/ptr.5605

Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, *133*(2), 253–260. https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032

Shahrubudin, N., Lee, T. C., & Ramlan, R. (2019). An overview on 3D printing technology: Technological, materials, and applications. *Procedia Manufacturing*, *35*, 1286–1296.

Shaik, M. R., Syed, R., Adil, S. F., Kuniyil, M., Khan, M., Alqahtani, M. S., Shaik, J. P., Siddiqui, M. R. H., Al-Warthan, A., & Sharaf, M. A. F. (2021). Mn3O4 nanoparticles: Synthesis, characterization and their antimicrobial and anticancer activity against A549 and MCF-7 cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(2), 1196–1202.

Sheng, J., Zhou, J., Wang, L., Xu, J., & Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. *European Food Research and Technology*, *225*, 249–253.

Sherchan, J. B., & Gurung, P. (2018). *Antibiotic Susceptibility Pattern of Bacterial Pathogens Isolated from Infected Lesions*.

Siemann, U. (2005). Solvent cast technology–a versatile tool for thin film production. In *Scattering methods and the properties of polymer materials* (pp. 1–14). Springer.

Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*(1), 206439. https://doi.org/10.1155/2015/206439

Silva, C. R., Baltazar, F., & Almeida-Aguilar, C. (2015). Propolis: A complex natural product, with an infinity of biological activities that can be explored for the development of medicines. Evid. *Based Complementary Altern. Med*, *2015*, 206439.

Silva, L. P. da, Pirraco, R. P., Santos, T. C., Novoa-Carballal, R., Cerqueira, M. T., Reis, R. L., Correlo, V. M., & Marques, A. P. (2016). Neovascularization induced by the hyaluronic acid-based spongy-like hydrogels degradation products. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(49), 33464–33474.

Silva, J. D. (2023). *Potencial do própolis português no biocontrolo de doenças da macieira*.

Silva, V. C., Silva, A. M. G. S., Basílio, J. A. D., Xavier, J. A., do Nascimento, T. G., Naal, R. M. Z. G., Del Lama, M. P., Leonelo, L. A. D., Mergulhão, N. L. O. N., & Maranhão, F. C. A. (2020). New insights for red propolis of alagoas—Chemical constituents, topical membrane formulations and their physicochemical and biological properties. *Molecules*, *25*(24), 5811.

Singh, R., Gupta, A., Tripathi, O., Srivastava, S., Singh, B., Awasthi, A., Rajput, S. K., Sonia, P., Singhal, P., & Saxena, K. K. (2020). Powder bed fusion process in additive manufacturing: An overview. *Materials Today: Proceedings*, *26*, 3058–3070.

Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, *61*, 695–702. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.001

Smith, W. F., & Rosa, M. E. (1998). *Princípios de ciência e engenharia de materiais*.

Snowman, J. W. (1997). Lyophilization. In *Handbook of Downstream Processing* (pp. 203–234). Springer.

Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M., & Juszczak, L. (2015). Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Natural Product Research*, *29*(5), 416–422.

Socrates, G. (2004). *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. John Wiley & Sons.

Solanki, R., & Nagori, B. P. (2013). A review on microorganisms causing wound infections on skin. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, *3*(3), 119–122.

Sørensen, O. E., Cowland, J. B., Theilgaard-Mönch, K., Liu, L., Ganz, T., & Borregaard, N. (2003). Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *The Journal of Immunology*, *170*(11), 5583–5589.

Soufi, O., Romero, C., & Louaileche, H. (2014). Ortho-diphenol profile and antioxidant activity of Algerian black olive cultivars: Effect of dry salting process. *Food Chemistry*, *157*, 504–510.

Standard, A. (n.d.). F2792, Standard Terminology for Additive Manufacturing Technologies. 2012. *ASTM International, West Conshohocken, Pa, USA*.

Stanicka, K., Dobrucka, R., Woźniak, M., Sip, A., Majka, J., Kozak, W., & Ratajczak, I. (2021). The effect of chitosan type on biological and physicochemical properties of films with propolis extract. *Polymers*, *13*(22), 3888.

Stefanowska, K., Bucher, M., Reichert, C. L., Sip, A., Woźniak, M., Schmid, M., Dobrucka, R., & Ratajczak, I. (2024). Chitosan-based films with nanocellulose and propolis as active packaging materials. *Industrial Crops and Products*, *219*, 119112.

Stephen-Haynes, J. (2008). Skin integrity and silicone: Appeel “no-sting” medical adhesive remover. *British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)*, *17*(12), 792–795. https://doi.org/10.12968/bjon.2008.17.12.30312

Stojko, M., Wolny, D., & Włodarczyk, J. (2021). Nonwoven releasing propolis as a potential new wound healing method—A review. *Molecules*, *26*(18), 5701.

Sulaeman, A., Marliyati, S. A., & Fahrudin, M. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of stingless bee propolis from Indonesia. *Journal of Apicultural Science*, *63*(1), 139–147.

Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., & Zhang, H. (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*(1), 595393.

Suriyatem, R., Auras, R. A., & Rachtanapun, P. (2018). Improvement of mechanical properties and thermal stability of biodegradable rice starch–based films blended with carboxymethyl chitosan. *Industrial Crops and Products*, *122*, 37–48.

Svečnjak, L., Marijanović, Z., Okińczyc, P., Marek Kuś, P., & Jerković, I. (2020). Mediterranean propolis from the adriatic sea islands as a source of natural antioxidants: Comprehensive chemical biodiversity determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP assay. *Antioxidants*, *9*(4), 337.

Tan, H. T., Rahman, R. A., Gan, S. H., Halim, A. S., Hassan, S. A., Sulaiman, S. A., & BS, K. K. (2009).

The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *9*, 34. https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-34

Tarassoli, S. P., Jessop, Z. M., Kyle, S., & Whitaker, I. S. (2018). Candidate bioinks for 3D bioprinting soft tissue. In *3D bioprinting for reconstructive surgery* (pp. 145–172). Elsevier.

Tchemtchoua, V. T., Atanasova, G., Aqil, A., Filée, P., Garbacki, N., Vanhooteghem, O., Deroanne, C., Noël, A., Jérome, C., Nusgens, B., Poumay, Y., & Colige, A. (2011). Development of a chitosan nanofibrillar scaffold for skin repair and regeneration. *Biomacromolecules*, *12*(9), 3194–3204. https://doi.org/10.1021/bm200680q

Thiele, S., & Salzer, R. (2003). Optical spectroscopy. *Handbook of Spectroscopy*, *2*, 441–468.

Tien, N. D., Lyngstadaas, S. P., Mano, J. F., Blaker, J. J., & Haugen, H. J. (2021). Recent developments in chitosan-based micro/nanofibers for sustainable food packaging, smart textiles, cosmeceuticals, and biomedical applications. *Molecules*, *26*(9). https://doi.org/10.3390/molecules26092683

Torlak, E., & Sert, D. (2013). Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. *International Journal of Biological Macromolecules*, *60*, 52–55.

Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics*, *12*(8), 1–30. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735

Tran, C. T. N., Brooks, P. R., Bryen, T. J., Williams, S., Berry, J., Tavian, F., McKee, B., & Tran, T. D. (2022). Quality assessment and chemical diversity of Australian propolis from Apis mellifera bees. *Scientific Reports*, *12*(1), 13574.

Treat, D. (1997). *MJ Cork*.

Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, *1*, 1–4.

Tsuda, T., & Kumazawa, S. (2021). Propolis: Chemical constituents, plant origin, and possible role in the prevention and treatment of obesity and diabetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(51), 15484–15494.

Uchida, D. T., & Bruschi, M. L. (2023). 3D Printing as a Technological Strategy for the Personalized Treatment of Wound Healing. *AAPS PharmSciTech*, *24*(1). https://doi.org/10.1208/s12249-023-02503-0

Vahur, S., Teearu, A., Peets, P., Joosu, L., & Leito, I. (2016). ATR-FT-IR spectral collection of conservation materials in the extended region of 4000-80 cm−1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*, 3373–3379.

Veiga, R. S., De Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A., Lira, I. S., López, B. G. -C., Negrão, V., & Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and Baccharis dracunculifolia DC. *Journal of Applied Microbiology*, *122*(4), 911–920. https://doi.org/10.1111/jam.13400

Vela-Anaya, G., Stegensek-Mejía, E. M., & Leija-Hernández, C. (2018). Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Revista de Enfermería Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *26*(2), 105–114.

Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsvetkova, I., & Kujumgiev, A. (2000). Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, *55*(9–10), 790–793.

Vieira, T. M., Barco, J. G., de Souza, S. L., Santos, A. L. O., Daoud, I., Rahalie, S., Amdouni, N., Bastos, J. K., Martins, C. H. G., & Ben Said, R. (2024). In Vitro and In Silico Studies of the Antimicrobial Activity of Prenylated Phenylpropanoids of Green Propolis and Their Derivatives against Oral Bacteria. *Antibiotics*, *13*(8), 787.

Vilela, C. de O. (2010). *Atividade antimicrobiana de extrato etanólico de própolis verde*. Universidade Federal de Pelotas.

Vučurović, A., Stanković, I., Nikolić, D., Milojević, K., Bulajić, A., & Krstić, B. (2016). Effect of propolis extract on Zucchini yellow mosaic virus inhibition in oilseed pumpkin. *III International Symposium on Organic Greenhouse Horticulture 1164*, 431–438.

Vujanovic, S., & Vujanovic, J. (2013). Bioresources in the pharmacotherapy and healing of burns: A mini-review. *Burns*, *39*(6), 1031–1038. https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.03.016

Wager LJ, & Leavesley DI. (2015). MicroRNA regulation of epithelial-to-mesenchymal transition during re-epithelialisation: assessing an open wound. *Wound Practice and Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, *23*(3), 132–142. www.woundsaustralia.com.au//journal/2303_06.pdf

Wang, T., Li, X., Zhang, B., Li, D., Liu, J., & Zhang, G. (2022). Basic reason for the accumulation of charge on the surface of polymer dielectrics. *Science China Materials*, *65*(10), 2884–2888.

Weddell, G. (1945). The anatomy of cutaneous sensibility. *British Medical Bulletin*, *3*(7–8), 167–172. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071903

Wieczorek, P. P., Hudz, N., Yezerska, O., Horčinová-Sedláčková, V., Shanaida, M., Korytniuk, O., & Jasicka-Misiak, I. (2022). Chemical variability and pharmacological potential of propolis as a source for the development of new pharmaceutical products. *Molecules*, *27*(5), 1600.

Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2023). Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Advances in Surgical and Medical Specialties*, 341–370. https://doi.org/10.1098/rsob.200223

Williams, M. (2021). Wound infections: an overview. *British Journal of Community Nursing*, *26*(Sup6), S22–S25.

Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, *77*(3), 509–528. https://doi.org/10.1016/S0039-6109(05)70566-1

Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, *37*(2), 99–105. https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961

Wojtacka, J. (2022). Propolis Contra Pharmacological Interventions in Bees. *Molecules*, *27*(15), 4914.

Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*, *25*(2), 92–98.

Wu, Q., Maire, M., Lerouge, S., Therriault, D., & Heuzey, M. (2017). 3D printing of microstructured and stretchable chitosan hydrogel for guided cell growth. *Advanced Biosystems*, *1*(6), 1700058.

Xie, Y., Yu, Y., Xie, H., Huang, F., & Hughes, T. C. (2022). 3D-printed heterogeneous Cu2O monoliths: Reusable supports for antibiotic treatment of wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, *436*, 129170.

Xu, T., Zhao, W., Zhu, J.-M., Albanna, M. Z., Yoo, J. J., & Atala, A. (2013). Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, *34*(1), 130–139.

Xu, Z., Han, S., Gu, Z., & Wu, J. (2020). Advances and Impact of Antioxidant Hydrogel in Chronic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, *9*(5), 1–11. https://doi.org/10.1002/adhm.201901502

Xue, M., & Jackson, C. J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, *4*(3), 119–136. https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485

Yahyah, H., Kameri-Mbote, P., & Kibugi, R. (2024). Implications of pesticide use regulation on soil sustainability in Uganda. *Soil Security*, *16*, 100133.

Yang, J., Pi, A., Yan, L., Li, J., Nan, S., Zhang, J., & Hao, Y. (2022). Research progress on therapeutic effect and mechanism of propolis on wound healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2022*(1), 5798941.

Yeh, C. J., Chen, C. C., Leu, Y. L., Lin, M. W., Chiu, M. M., & Wang, S. H. (2017). The effects of artocarpin on wound healing: In vitro and in vivo studies. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–13. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15876-7

Young, L. (2012). Identifying infection in chronic wounds. *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, *20*(1), 38–44.

Yuan, Q., Shah, J., Hein, S., & Misra, R. D. K. (2010). Controlled and extended drug release behavior of chitosan-based nanoparticle carrier. *Acta Biomaterialia*, *6*(3), 1140–1148.

Zhu, L., Zhang, J., Yang, H., Li, G., Li, H., Deng, Z., & Zhang, B. (2023). Propolis polyphenols: A review on the composition and anti-obesity mechanism of different types of propolis polyphenols. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1066789.

Zin, N. B. M., Azemin, A., Rodi, M. M. M., & Mohd, K. S. (2018). Chemical composition and antioxidant activity of stingless bee propolis from different extraction methods. *Int. J. Eng. Technol*, *7*, 90–95.

Zin, N. B. M., Azemin, A., Rodi, M. M. M., Rashid, Z. M., & Mohd, K. S. (2019). Application of FTIR fingerprints coupled with chemometric for comparison of stingless bee propolis from different extraction methods. *MJFAS*, *15*, 350–355.