

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/11/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

DAPHNE DE CAMARGO REIS MELLO

**HIDROGEL DE QUITOSANA COM NANOFIBRAS DE
POLICAPROLACTONA (PCL) ASSOCIADO A EXTRATOS
FITOTERÁPICOS NO METABOLISMO CELULAR E AÇÃO
ANTIMICROBIANA: estudo *in vitro***

DAPHNE DE CAMARGO REIS MELLO

**Hidrogel de quitosana com nanofibras de Policaprolactona (PCL)
associado a extratos fitoterápicos no metabolismo celular e ação
antimicrobiana: estudo *in vitro***

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de Pesquisa: Doenças Infecciosas de Interesse Médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Mello, Daphne de Camargo Reis

Hidrogel de quitosana com nanofibras de Policaprolactona (PCL) associado a extratos fitoterápicos no metabolismo celular e ação antimicrobiana: estudo in vitro / Daphne de Camargo Reis Mello. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.

119 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos.

1. Quitosana. 2. Hidrogel. 3. Nanofibras. 4. Biofilme. 5. Fitoterápicos. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assoc. Alexandre Luiz Souto Borges

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Jonatas Rafael de Oliveira

Universidade Anhembí Morumbi

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Felipe Eduardo de Oliveira

Universidade Braz Cubas

Mogi das Cruzes- São Paulo

São José dos Campos, 6 de novembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e especialmente as pessoas mais incríveis que Ele colocou em meu caminho para me apoiar nessa jornada tão intensa:

Meu esposo Felipe por acreditar em mim e me apoiar incondicionalmente, mesmo nas vezes que eu estive esgotada. Obrigada amor pela parceria!

Aos meus filhos Henrique e Alice por compreenderem minha ausência com tanta doçura e por me devolverem tanto amor e coragem!

Meus pais Gini e Nivaldo por terem me dado toda a base para que essa meta fosse cumprida.

Minha irmã Débora, minha melhor amiga de toda vida! Obrigada por seu apoio e aconselhamento!

Meus sogros Betty e Elias por sua disponibilidade infinita em me socorrer com as crianças e dedicar tanto amor, cuidado e atenção para eles.

A querida Tia Cida, meu anjo da guarda que lutou ao meu lado todos os dias sempre torcendo por mim.

Minha amiga Hanna foi a grata surpresa que o Doutorado me trouxe! Obrigada por sua amizade, compreensão e apoio todas as vezes que precisei! Rimos e choramos muitas vezes juntas e levarei isso comigo sempre.

A querida amiga Dr^a Camilla Nunes pela amizade, carinho e socorro nas estatísticas da vida! Nossas conversas, risadas e cafés maravilhosos sempre estarão em minha memória!

Obrigada a cada um de vocês que fizeram uma enorme diferença em minha vida! Essa dedicatória é uma singela forma de agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela oportunidade de alcançar esse sonho.

Obrigada a toda minha família e amigos pelo suporte.

A minha orientadora Prof^a. Assoc. Luana Marotta Reis de Vasconcellos: muito obrigada por acreditar em mim e permitir que eu trilhasse um caminho desconhecido na jornada do Doutorado. Agradeço de coração todo o aprendizado e todas as oportunidades de trabalho e crescimento que você me proporcionou. Obrigada por todas as vezes em que fui vista também como mãe e não somente aluna. Obrigada pela compressão e sensibilidade nos momentos difíceis que enfrentei durante essa jornada. Foram anos intensos que levarei por toda vida. Muito obrigada por tudo!

A Prof^a Assoc. Luciane Dias de Oliveira meu agradecimento por toda sua colaboração e disponibilidade nas vezes em que precisei. Obrigada por seu carinho e atenção.

Obrigada ao Prof. Alexandre Luiz Souto Borges pela oportunidade de participar dessa linha de pesquisa tão encantadora.

Obrigada aos queridos amigos Dr. Jonatas Rafael de Oliveira e Dr. Felipe Eduardo Oliveira que mesmo de longe sempre me ajudaram quando precisei. Ter a presença de vocês em minha banca é uma alegria e uma honra! Vocês são inspiração!

Meu agradecimento ao Prof Adriano Bressane por sua preciosa contribuição nas Estatísticas na área de Microbiologia desta tese. Muito obrigada por seu trabalho.

Obrigada também a querida amiga Dr^a Stephanie Botti Dias que me incentivou a descobrir esse universo de conhecimento da Pós-Graduação.

Meu agradecimento as queridas Dr^a. Daniela Vicensotto e Dr^a Camila Lopes pelo carinho e amizade!

Obrigada a querida Dra Tábata Prado Sato pela dedicação, cuidado, paciência e carinho na produção dos hidrogéis. Foi um enorme prazer ter essa parceria contigo, obrigada pela amizade!

Obrigada a querida Pâmela Beatriz do Rosário Estevam dos Santos que de maneira

tão gentil dividiu seu conhecimento comigo na área da Microbiologia e me ajudou na construção dessa tese.

Meu agradecimento a Dr^a Lais Morandini pela sua colaboração nos artigos que frutificaram dessa tese. Muito obrigada pela sua dedicação, paciência e amizade!

A querida Damara Ávila que mesmo à distância se disponibilizou a me ajudar, muito obrigada por sua atenção.

Meu agradecimento também ao Dr. Lucas de Paula Ramos por sua contribuição no teste de ELISA.

A todos os colegas da Pós-graduação que de alguma maneira contribuíram para que eu concluísse minha tese: Suelen Simoes, Sabrina Liberato, Vanessa Meccatti, Renata Mendonça Moraes, Dr^a Noala Vicensoto Moreira Milhan, muito obrigada!

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Obrigada ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Associada Luciane Dias Oliveira.

Meu agradecimento a todos os docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Agradeço ao Laboratório de Estudos Interdisciplinares de Células (LEIC) na pessoa da Prof^a Assoc Luana Marota Reis de Vasconcellos. Agradeço ao Laboratório de Anaeróbios (LANA) na pessoa da Profa. Assoc Luciane Dias de Oliveira.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia e todos os funcionários na pessoa da Profa. Juliana Campos Junqueira. Agradeço ao Laboratório de Química do ITA e todos os funcionários que gentilmente colaboraram com essa tese na pessoa do Prof Koshun Iha e Prof. Priscila Fernandes.

À equipe da Biblioteca pela contribuição com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas na pessoa da Renata Aparecida Couto Martins.

Agradeço a secretária Carla Tavares por toda sua colaboração.

Obrigada a todos os funcionários da secretaria da Pós-graduação: Bruno

Shiguemitsu Marques Tanaka, Carolina Lourenço Rei e Sandra Mara Cordeiro

Obrigada a todos os funcionários da limpeza e da portaria.

“They say that the best blaze burns brightest when the circumstances are their worst”

Hayao Miyazaki

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	09
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Amostras	20
3.1.1 Síntese dos hidrogéis	21
3.1.2 Caracterização do hidrogel associado a nonofibras.....	23
3.1.3 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	25
3.1.3.1 Cultura de células.....	25
3.1.3.2 Viabilidade celular.....	27
3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fitoterápicos	29
3.2.1 Determinação da CIM e CMM.....	29
3.2.2 Teste de <i>Checkerboard</i>	34
3.2.3 Análise em UV-VIS.....	37
3.3 Fluxograma da produção dos hidrogéis e escolha dos fitoterápicos	38
3.4 Cultura de Células	41
3.4.1 Determinação da viabilidade celular.....	41
3.4.2 Análise da concentração de proteína total.....	42
3.4.3 Análise das citocinas	42
3.4.4 Ensaio de genotoxicidade por micronúcleo	43
3.5 Avaliação da formação de biofilmes microbianos	44
3.6 ESTATÍSTICA	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Hidrogéis	47
4.1.1 Protocolo para neutralização do hidrogel	48
4.1.2 Estereomicroscopia	50

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	51
4.1.4 Molhabilidade.....	52
4.1.5 Intumescimento	53
4.1.6 Viabilidade celular	55
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fitoterápicos	56
4.2.1 Concentração Inibitória Mínima	56
4.2.2 Concentração Microbicida Mínima.....	57
4.2.3 Análise por meio do teste de <i>Checkerboard</i>	58
4.2.4 UV-VIS.....	61
4.3 Viabilidade celular dos hidrogéis.....	64
4.4 Proteína Total.....	66
4.5 Teste de ELISA	68
4.6 Genotoxicidade.....	72
4.7 Biofilmes Microbianos Monotípicos	76
4.7.1 Avaliação do comportamento dos hidrogéis	76
4.7.2 Avaliação do comportamento dos microrganismos	78
5 DISCUSSÃO	81
6 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion (ágar ou caldo)
CH	Quitosana
CHX	Hidrogel de quitosana xantana PCL
CHXP	Hidrogel de quitosana xantana PCL associado a própolis
CHXG	Hidrogel de quitosana xantana PCL associado a gengibre
CHXPG	Hidrogel de quitosana xantana PCL associado a própolis e gengibre
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMM	Concentração Microbica Mínima
CMF	Concentração Microbica Fracionada
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EE	Eficiência de Encapsulamento
G	Gengibre
GP	Glicerofosfato
HaCat	Linhagem celular de queratinócitos humanos
HFF-1	Linhagem celular de fibroblastos humanos
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
ICMF	Índice de Concentração Microbica Fracionada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Corante [brometo de 3-4,5 dimetiltiazol]
P	Própolis
PBS	Phosphate Buffered Saline (solução tampão)
PCL	Policaprolactona (polímero)
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
X	Xantana (goma)

Reis Mello DC. Hidrogel de quitosana com nanofibras de policaprolactona (PCL) associado a extratos fitoterápicos no metabolismo celular e ação anti-microbiana: estudo *in vitro* [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

O objetivo neste estudo foi produzir hidrogel de quitosana (CH) com PCL e fitoterápicos para uso preventivo de úlcera de pressão. Os hidrogéis de CH foram produzidos com glicerofosfato (GP) e com xantana (X), associados ao PCL e foram caracterizados por estereomicroscópio, intumescimento, molhabilidade e MEV. Posteriormente foram submetidos ao teste de viabilidade (MTT) com fibroblastos HFF-1 e queratinócitos HaCat. O hidrogel que apresentou melhor resultado foi escolhido para continuar na pesquisa. Posteriormente, extratos de *Pfaffia paniculata* K, *Juglans regia* L, *Rosmarinus officinalis* L, *Zingiber officinale*, *Própolis* e *Hamamelis* foram colocados em contato com cepas de *Staphylococcus aureus* (S.a) (ATCC 6538), *Streptococcus pyogenes* (S.p) (ATCC 19615), *Staphylococcus epidermidis* (S.e) (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) (ATCC 15442), *Escherichia coli* (E.c) (ATCC 25922) e *Klebsiella Pneumoniae* (K.p) (ATCC 4352) na forma planctônica nos testes de CIM e CMM. Os dois melhores extratos fitoterápicos foram avaliados quanto ao sinergismo no teste *checkerboard* e posteriormente associados ao hidrogel anteriormente eleito. A seguir, o comportamento da HaCat e HFF-1 com os hidrogéis foi analisado por MTT, proteína total, ELISA, genotoxicidade e formação de biofilme monotípico com suspensões padronizadas (10^7 cel/mL) de S.a, S.e, S.p, P.a, E.c e K.p. Na caracterização e viabilidade o hidrogel CHX PCL apresentou os melhores resultados. Os extratos selecionados após CIM, CMM e *checkerboard* foram gengibre (G) e própolis (P). O extrato G se destacou na CIM com inibição de K. p e P. a. Os extratos de G e P demonstraram ação microbida para K. p e P. a e somente o extrato P obteve ação microbida para S. a na CMM. Houve ação aditiva dos extratos associados no *checkerboard* para S.p e ação aditiva e sinérgica para S. e. Os grupos de hidrogéis foram compostos por: quitosana xantana (CHX), CHX própolis (CHXP), CHX gengibre (CHXG) e CHX própolis e gengibre associados (CHXPG), todos associados ao PCL. Todos os hidrogéis demonstraram viabilidade celular acima de 70% do grupo controle, permitindo metabolismo celular observado na proteína total. Houve quantificação de IL-6 maior no grupo CHX nas duas linhagens de células enquanto a quantificação de IL-10 não exibiu diferença estatística entre os grupos. Todos os hidrogéis promoveram redução acentuada de biofilme de K.p e E.c. Os grupos CHX, CHXP e CHXG reduziram biofilme de S.e. O grupo CHXG reduziu biofilme de S.p. Para S.a e P.a o grupo CHXPG foi mais eficaz reduzindo biofilme. Concluímos que os hidrogéis apresentaram resultados satisfatórios e promissores, trazendo inovação por associação de biopolímeros e associação de extratos fitoterápicos pouco estudados. Os resultados positivos justificam a continuidade dos estudos com esse biomaterial.

Palavras-chave: Quitosana. Hidrogel. Nanofibras. Biofilme. Fitoterápicos. Fibroblastos. Queratinócitos.

Reis Mello DC. Evaluation of the chitosan hydrogel with PCL nanofibers associated with phytotherapeutic extracts in cellular and microbiological activity: in vitro study [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

The aim of this study was to produce chitosan hydrogel (CH) with PCL and herbal medicines for preventive use of pressure ulcers. The CH hydrogels were produced with glycerophosphate (GP) and xanthan (X), associated with PCL and were characterized by stereomicroscope, swelling, wettability and SEM. Subsequently, they were submitted to a viability test (MTT) with HFF-1 fibroblasts and HaCat keratinocytes. The hydrogel that presented the best result was chosen to continue the research. Subsequently, extracts of *Pfaffia paniculata* K, *Juglans regia* L, *Rosmarinus officinalis* L, *Zingiber officinale*, Propolis and Hamamelis were placed in contact with strains of *Staphylococcus aureus* (Sa) (ATCC 6538), *Streptococcus pyogenes* (Sp) (ATCC 19615), *epidermidis* (Se) (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) (ATCC 15442), *Escherichia coli* (Ec) (ATCC 25922) and *Klebsiella Pneumoniae* (Kp) (ATCC 4352) in planktonic form in CIM and CMM tests. The two best herbal extracts were evaluated for synergism in the checkerboard test and subsequently associated with the previously elected hydrogel. Next, the behavior of HaCat and HFF-1 with hydrogels was analyzed by MTT, total protein, ELISA, genotoxicity and monotypic biofilm formation with standardized suspensions (107 cel / mL) of Sa, Se, Sp, Pa, Ec and Kp. In the characterization and viability the CHX PCL hydrogel presented the best results. The extracts selected after MIC, CMM and checkerboard were ginger (G) and propolis (P). The G extract stood out in the MIC with inhibition of K. p and P. a. The extracts of G and P showed microbicidal action for K. p and P. a and only the extract P obtained microbicidal action for S. a in CMM. There was an additive action of the associated extracts on the checkerboard for S.p and an additive and synergistic action for S. e. The hydrogel groups were composed of: xanthan chitosan (CHX), CHX propolis (CHXP), CHX ginger (CHXG) and CHX propolis and ginger associated (CHXPG), all associated with PCL. All hydrogels demonstrated cell viability above 70% of the control group, allowing cellular metabolism observed in the total protein. There was a greater quantification of IL-6 in the CHX group in the two cell lines while the quantification of IL-10 did not show statistical difference between the groups. All hydrogels promoted a marked reduction in the biofilm of K.p and E.c. The CHX, CHXP and CHXG groups reduced S.e biofilm. The CHXG group reduced S.p. For S.a and P.a, the CHXPG group was more effective in reducing biofilm. We conclude that the hydrogels presented satisfactory and promising results, bringing innovation through association of biopolymers and association of phytotherapeutic extracts little studied. The positive results justify the continuity of studies with this biomaterial.

Keywords: Chitosan. Hydrogel. Nanofibres. Biofilm. Phytotherapy. Fibroblasts. Keratinocytes

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros como a quitosana são estudados em um número crescente e os resultados relatam sua potencial utilização em aplicações de pesquisas na área biomédica, tais como encapsulamento de células, carregamento de fármacos e engenharia de tecidos (Lawrie et al., 2007). A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina, sendo o segundo biopolímero mais abundante na natureza, uma vez que é encontrado em exoesqueletos de crustáceos, insetos, moluscos e parede celular de fungos. Esse biopolímero é amplamente desperdiçado pela indústria, devido à sua relativa dificuldade de manuseio e limitada solubilidade (Gopalan Nair, Dufresne, 2003; Ifuku, 2014).

Por outro lado, a quitosana e seus derivados têm sido pesquisados como fonte natural para a produção de hidrogéis e compósitos em diversos campos, incluindo curativos, principalmente devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, abundância, baixo custo e a compatibilidade ambiental (Carvalho, Mansur, 2017).

A integração de matrizes biológicas, tais como a quitosana, com hidrogéis tem sido usada para desenvolver dispositivos para engenharia de tecidos, principalmente da pele e cartilagem (Weinstein-Oppenheimer et al., 2017). Hidrogéis são compostos por cadeias poliméricas hidrofílicas que absorvem grandes quantidades de água e não se dissolvem devido a presença de reticulações (Peppas et al., 2006). Hidrogéis têm sido usados em aplicações científicas e industriais (Weinstein-Oppenheimer et al., 2017), e comparado a outros sistemas, os hidrogéis são mais vantajosos pois permitem a incorporação de agentes bioativos e/ou células devido a diversas condições de processamento além da entrega dos agentes bioativos ser prolongada superando assim a aplicação tópica (Rice et al., 2013). A combinação de substâncias orgânicas e inorgânicas tem sido explorada no desenvolvimento de biomateriais híbridos, atraindo grande atenção para o *design* de dispositivos médicos (Li et al., 2016).

Os biomateriais híbridos são compostos por diferentes tipos de materiais, sendo um utilizado como base e o outro como material ativo ou para impregnação. Os materiais base geralmente usados são os polímeros e nesta classe o PCL

(policaprolactona) vem se destacando devido à sua biodegradabilidade ajustável. PCL é um polímero linear, hidrofóbico sintético que foi aprovado pela US Food and Drug Administration (FDA) como um componente utilizado em diversos suportes utilizados para a base de biomateriais, uma vez que pode ser produzido na forma de nanofibras. Além disso, a degradação do PCL não produz um ambiente local ácido e este material é relativamente barato que o torna adequado para *electrospinning* (Hsu et al., 2016).

Eletrofiação (*Electrospinning*) é uma técnica utilizada para produzir as nanofibras, as quais são usadas com frequência no campo da engenharia de tecidos para produzir materiais que mimetizem a matriz extracelular. Um dos materiais mais usados na eletrofiação eletrofiação é a policaprolactona (PCL) por ser um polímero biodegradável, biocompatível, possuir alta elasticidade e resistência a tração. Estas propriedades contribuem para que a sua estrutura não sofra colapso durante a formação de tecido (Jung et al., 2013). Independente do método de produção, o desenvolvimento de dispositivos para engenharia de tecidos da pele tem sido utilizado na integração de matrizes biológicas com hidrogéis (Weinstein-Oppenheimer et al., 2010, Man et al., 2016).

A pele funciona principalmente como uma barreira protetora contra o meio ambiente, sendo que a perda da sua integridade desencadeia imediatamente processos complexos que visam restaurar a função de barreira epidérmica. Os fibroblastos são as células predominantemente encontradas em tecidos conjuntivos, como na derme, e também em tecidos conjuntivos danificados, sendo importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos (Pan et al., 2006). Os queratinócitos têm papel fundamental na regeneração da pele por serem os principais responsáveis pela formação de todas as camadas da epiderme. Seu cultivo em laboratório tem importância fundamental para a investigação da citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo, dos distúrbios mitocondriais gerados e das alterações no potencial antioxidante intracelular, entre outros (Berendji et al., 1999).

Lesões de pressão, também conhecidas como úlceras de pressão, são áreas danificadas na pele devido à pressão e/ou fricção e cisalhamento (Stadnyc et al., 2018). O reparo de feridas é um processo biológico extremamente complexo, basicamente dividido em três fases que se sobrepõem: inflamação, formação de

novos tecidos e remodelação. O primeiro estágio é caracterizado por hemostasia e por iniciar uma resposta inflamatória controlada. A liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, incluindo quimiocinas e fatores de crescimento, orquestram a atração de macrófagos e granulócitos para a área da ferida para remover o tecido morto e prevenir a infecção bacteriana. O segundo estágio inclui migração e proliferação de queratinócitos (reepitelização) e fibroblastos (formação de tecido de granulação e matriz extracelular) bem como angiogênese. Durante o terceiro estágio o colágeno antigo é substituído e uma cicatriz é formada. Logo, a cicatrização de feridas requer a integração de muitos eventos celulares e moleculares complexos que podem ser direcionados em muitos pontos, levando à cicatrização acelerada ou retardada, sendo que o atraso neste processo pode conduzir ao desenvolvimento de feridas crônicas (Ebeling et al., 2014).

As úlceras de pressão representam um problema considerável para os profissionais de saúde e seus pacientes, embora seja possível evitá-la (Rae et al., 2018). Houve um aumento na prevalência de úlcera de pressão em 11 países de 1,1% para 26,7% no ambiente hospitalar e de 6% para 29% na comunidade (Graves, Zheng, 2014). Estudos epidemiológicos mostraram que fatores de risco para o desenvolvimento de úlcera de pressão são: nível de mobilidade; integridade da pele; presença de comorbidades que impactam na oxigenação tecidual ou perfusão sanguínea; estado de nutrição da pele; e microclima da pele como temperatura e umidade (Rae et al., 2018).

As feridas abertas deixam com maior risco de colonização por patógenos oportunistas, além de proporcionar uma superfície para crescimento de patógenos; menor fluxo sanguíneo e hipoxia, os quais são fatores que prejudicam as defesas naturais, criando um ambiente ideal para o crescimento bacteriano. As bactérias que colonizam o leito da ferida aberta formam comunidades multicelulares ligadas à superfície chamadas biofilmes (Kirker, James, 2017). A propriedade chave do biofilme é o aumento da resistência antimicrobiana, imunológica, predatória e química. Uma vez estabelecidos, os biofilmes tornam-se altamente tolerantes à remoção e erradicação. Neste ambiente, as células microbianas exibem um fenótipo alterado, particularmente em relação à taxa de crescimento e a transcrição de genes (Percival et al., 2012). A estrutura do biofilme pode restringir a penetração do agente antimicrobiano. A matriz extracelular do biofilme também pode ligar-se, reter e

neutralizar enzimas em concentrações que poderiam inativar um antibiótico (Marsh, 2005).

Em termos de morbidade e mortalidade as infecções de feridas representam um grande problema de saúde. Micro-organismos como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae* são relatados como importantes causadores de infecções de feridas (Pattanaya et al., 2008, European Wound Management Association (EWMA 2005).

Nas úlceras crônicas encontra-se uma microbiota de colonização complexa e dinâmica, sendo o *S. aureus* frequentemente o patógeno mais comum e com o maior nível de virulência (Gomes et al., 2014).

Devido a estas complicações, ao evitarmos o surgimento de úlceras de pressão na pele do paciente, protegemos o mesmo de maiores complicações em seu quadro clínico geral, reduzimos os custos com tratamentos de feridas que podem ser evitadas e devolvemos qualidade de vida ao indivíduo. Nesse contexto, o desenvolvimento de biomateriais para uso preventivo torna-se necessário para desenvolver uma estratégia de terapia eficiente.

De modo geral, as infecções bacterianas representam um problema significativo para a saúde do paciente e geralmente são tratadas por agentes antimicrobianos. Essa situação proporcionou aumento da prevalência de resistência por patógenos já conhecidos e também o surgimento de novos organismos resistentes, resultando em atraso de terapia eficaz, aumento no tempo de hospitalização gerando aumento de custo para o paciente (Andrew et al., 2011).

O uso de plantas e seus derivados para o tratamento de doenças é um conhecimento antigo, que continuam a ser consideradas como agentes potenciais para a prevenção e tratamento de doenças nos últimos anos (Fahimi et al., 2015). Na Medicina tradicional chinesa, por exemplo, o uso de plantas para o tratamento de doenças ocorre há mais de 3.000 anos. O livro *The Devine Farmer's Classic of Herbalism* (Yang, Cao, 1998) é o compilado mais conhecido e representativo dessa cultura, trazendo informações e metodologias do conhecimento sobre plantas medicinais. A origem desse conhecimento é derivada da cultura popular, em crenças e experiências indígenas. Atualmente, com o desenvolvimento de tecnologias e o avanço da ciência, a fitoterapia se tornou um ramo de estudo com um aumento

crescente de pesquisas que verificam efeitos biológicos de substâncias derivadas de plantas (Yang, Cao, 1998; Sargin et al., 2013; Farooqui et al., 2015).

A *Pfaffia paniculata* K, conhecida como o Ginseng brasileiro é utilizada popularmente para o tratamento de reumatismo e diabetes entre outros (Freitas et al., 2004). O extrato dessa raiz possui propriedades antioxidantes, efeitos analgésicos e anti-inflamatório (Leal et al., 2010).

Juglans regia L é o nome científico da Nogueira, pertencente à família Juglandaceae, árvore nativa do sudeste da Europa. Seus frutos conhecidos popularmente como noz européia são ricos em óleos compostos por ácidos graxos insaturados. Os frutos verdes produzem um licor rico em antioxidantes naturais como ácido ascórbico, tocoferóis e polifenóis (Almeida et al., 2008; Fernández-Agulló et al., 2013; Joshan, Singhb, 2013). Já as folhas são muito utilizadas popularmente para tratamento de doenças da pele como úlceras e irritações cutâneas. Outras propriedades dessas folhas incluem ação antidiarreica e anti-helmíntica, insuficiência venosa e ação adstringente (Fernández-Agulló et al., 2013; Rather et al., 2012).

Rosmarinus officinalis L. é um arbusto da região Mediterrânea, pertencente a família Lamiaceae que tem sido usada para fins medicinais no tratamento de bactérias e infecções fúngicas. Apresenta ação preventiva e/ou curativa em doenças como asma, amigdalite, obstrução nasal, e constipação. Possui monoterpenos antibacterianos e potencial antifúngico, especialmente contra bactérias Gram-positivas (Ramos et al., 2016).

Zingiber officinale, conhecido como gengibre, é uma planta amplamente utilizada para tratamento de gripes e resfriados além de possuir ação hiperemiante, estimular a circulação periférica e exibir ação anti-inflamatória. O estudo de Maekawa et al. (2013) demonstrou eficácia do extrato de gengibre para *Escherichia coli*. Contudo, novos estudos são necessários para avaliar sua toxicidade e sua atividade antimicrobiana, pois apesar de ser um extrato natural, seu uso indevido e doses em excessos podem causar efeitos tóxicos e prejudiciais à saúde (D'Souza et al., 2017).

A *Hamameliaceae* (Hamamelis) é uma planta que exibe seus principais compostos ativos nas folhas e casca, consistem em diferentes taninos: ácido gálico, hamamelitannin, e proantocianidinas condensadas. Possui propriedades anti-

inflamatória e potencial anti-oxidante. É comumente usada para a pele por ser adstringente e também em furúnculos, contusões e picadas de insetos. Atualmente, *Hamamelis* é usado em pós-barba para aliviar a pele irritada, em hidratantes para tratar a acne, e no cabelo como spray (Colantonio, Rivers, 2017).

A própolis é uma mistura complexa produzida por abelhas melíferas para a proteção da colmeia a partir de pólen, flores, ramos e exsudatos de plantas adicionados às secreções salivares destes insetos (Alves et al. 2013). Possui substâncias bioativas, como compostos fenólicos - ácidos graxos, flavonóides, álcoois aromáticos e ésteres (Longhini et al., 2007). Possui atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antifúngica, hepatoprotetora, antitumoral, antioxidante, antiviral e antimicrobiana (Lustosa et al., 2008; Maekawa et al., 2013; Alves et al., 2013).

A resistência dos micro-organismos a fármacos tem aumentado exponencialmente, seja na área médica, odontológica ou até mesmo alimentícia, tornando o combate a bactérias e fungos um desafio. O uso indiscriminado e errôneo de antimicrobianos, a grande capacidade de adaptação dos microrganismos e diversos outros fatores favorecerem a resistência estabelecida hoje (Kent et al., 2015). Dentro do aspecto de combate aos patógenos resistentes, a fitoterapia surge como uma opção promissora. Além dos remédios convencionais, os fitoterápicos podem ser uma alternativa interessante para influenciar positivamente os diferentes estágios de cicatrização de feridas (Ebeling et al., 2014). Oferecendo novas possibilidades para o tratamento de diversas doenças como na pele. Essas terapias melhoram o acesso à saúde, permitindo a superação de algumas limitações como os altos custos, os longos tempos de fabricação e o aumento da resistência bacteriana. Um dos mais complexos processos em humanos é o reparo de lesões cutâneas, uma vez que ocorre uma sobreposição de eventos bioquímicos e celulares por meio do desenvolvimento de uma longa cascata orquestrada. Os produtos naturais são usados para estimular o processo de regeneração e impedir o insucesso da cura da ferida e têm demonstrado resultados promissores (Pereira et al., 2016).

Esta tese, portanto, se propôs a explorar as características da quitosana hidrogel com nanofibras de PCL associada a fitoterápicos, visando futuramente a

criação de um biomaterial para uso preventivo de lesões de pressão que acometem pacientes acamados e cadeirantes. Para isso, analisou-se a influência deste hidrogel no comportamento celular *in vitro* dos fibroblastos e queratinócitos, bem como seu efeito sobre biofilme microbiano, utilizando-se para isso, diversos parâmetros que se correlacionam e são capazes de fornecer informações mais completas a respeito deste biomaterial.

6 CONCLUSÃO

Com base em nossos resultados, pode-se concluir que:

- a) sintetizamos com sucesso hidrogéis de quitosana e que o hidrogel de CHX é um candidato superior para aplicações biomédicas, como reparo de tecidos cutâneos;
- b) os extratos de própolis e gengibre obtiveram os melhores resultados nos testes de avaliação inibitória e microbicida. A associação desses dois extratos demonstrou de forma geral ser positiva contra o grupo de microrganismos estudados na forma planctônica, exceto para *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Observou-se efeito sinérgico e aditivo dos extratos de própolis e gengibre combinados sobre *S. epidermidis* e além disso encontramos concentrações aditivas sobre *E.coli*, e *S.pyogenes*. Sendo assim, esses resultados satisfatórios justificaram a continuidade dos estudos da associação de própolis e gengibre sobre os microrganismos estudados;
- c) os hidrogéis associados aos extratos obtiveram resultados satisfatórios com as duas linhagens de células, porém a adição dos extratos na resposta da HaCat obteve resultados mais padronizados nos testes executados enquanto as células HFF-1 por vezes apresentou resultados oscilatórios;
- d) na avaliação microbiológica dos biofilmes monotípicos observamos redução na resposta dos microrganismos com todos os hidrogéis associados ao própolis e gengibre;
- e) na maior parte dos testes executados com células o grupo CHXP e CHXPG obtiveram melhor desempenho e com os microrganismos, todos os grupos de hidrogéis foram eficazes;
- f) conclui-se finalmente que o hidrogel CHXPG tem grande potencial inovador para uso biomédico que justificam a continuidade dos estudos do mesmo.

REFERÊNCIAS*

- Abozahra R, Abdelhamid SM, Wen MM, Abdelwahab I, Baraka K. A nanoparticles based microbiological study on the effect of Rosemary and Ginger essential oils against *Klebsiella pneumoniae*. *Open Microbiol J*. 2020;14:205-12. doi: 10.2174/1874285802014010205.
- Aghazadeh M, Bialvaei AZ, Kabiri F, Saliani N, Yousef M, Eslami H, et al. Survey of the antibiofilm and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* (*in vitro* study) Jundishapur. *J Microbiol*. 2016;9:e30167. doi: 10.5812/jjm.30167.
- Ahmadi R, de Bruijn JD. Biocompatibility and gelation of chitosan–glycerol phosphate hydrogels. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86(3):824-32. doi:10.1002/jbm.a.31676.
- Ajige LA, Sunday TO, Elkanah FA, Awe AA, Ayoola AS, Sunday RM. Comparative study of antibacterial effects of *Curcuma longa* Linn. and *Zingiber officinale* Rosc. Rhizomes. *MRJI*. 2017;18(6):1-8. doi: 10.9734/MRJI/2017/31551.
- Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial activities of european Propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines (Basel)*. 2018;5(1):1-17. doi:10.3390/medicines5010002.
- Al-Waili N, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y, Salom K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int J Med Sci*. 2012; 9(9):793-00. doi:10.7150/ijms.4722.
- Ali AMA, El-Nour MEM, Mohammad O, Yagi SM. In vitro anti-inflammatory activity of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) rhizome, callus and callus treated with some elicitors. *J Med Plants Res*. 2019;13(10):227-35. doi: 10.5897/JMPR2019.6758.
- Almeida IF, Fernandes E, Lima JLFC, Costa PC, Bahia MF. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chem*. 2008;106:1014–20. doi: 10.1089/ten.tea.2014.0443.
- Alves E, Kubota EH. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Rev Cienc Farm Básica Apl*. 2013; 34(1):37-1. ISSN 1808-4532.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2020 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Andriotis EG, Eleftheriadis GK, Karavasili C, Fatouros DG. Development of bio-active patches based on Pectin for the treatment of ulcers and wounds using 3D-bioprinting technology. *Pharmaceutics*. 2020;12:56. doi: 10.3390/pharmaceutics12010056.

Azu NC, Onyeagba RA. Antimicrobial properties of extracts of *Allium cepa* (Onions) and *Zingiber officinale* (Ginger) on *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, and *Bacillus subtilis*. *Int J Trop Med*. 2007;3(2):1-7.

Bachiega TF, Orsatti CL, Pagliarone AC, Sforcin JM. The effects of propolis and its isolated compounds on cytokine production by murine macrophages. *Phytotherapy Res*. 2012;26:1308-13. doi:10.1002/ptr.3731.

Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regul Toxic Pharmacol*. 2010;56(3):290–99. doi:10.1016/j.yrtph.2009.09.015.

Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Kroncke KD. Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide mediated stress. *Free Rad Biol Med*. 1999;(27):773-80. doi: 10.1016/s0891-5849(99)00123-9.

Berger RG. Bioactivity of essential oils and their components. in: *flavors and fragrances: chemistry, bioprocessing, and sustainability*. Springer Berlin. 2007;88-0. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6>.

Berretta AA, Nascimento AP, Bueno PC, Vaz MM, Marchetti JM. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. *Int J Biol Sci*. 2012;8(4): 512–21. doi: 10.7150/ijbs.3641.

Boulogne F, Ingremeau F, Limat L, Stone HA. Tuning the receding contact angle on hydrogels by addition of particles. *Langmuir*. 2016;32(22):5573-79. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b01209.

Búfalo MC, Bordon-Graciani AP, Conti BJ, de Assis Golim M, & Sforcin JM. The immunomodulatory effect of Propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(10):1497–504. doi: 10.1111/jphp.12279.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol*. 2004;94:223-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

Bhattachar S. Natural antimutagens: A review. *Res J Med Plant*. 2011;5:116–26. doi: 10.3923/RJMP.2011.116.126.

Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive Protein. *J Biol Chem*. 2004;279(47): 48487-490. doi: 10.1074/jbc.R400025200

Capella V, Rivero RE, Liaudat AC, Ibarra LE, Roma DA, Alustiza F, et al. Cytotoxicity and bioadhesive properties of poly-*N*-isopropylacrylamide hydrogel. *Heliyon*. 2019;5(4):e01474. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01474. PMID: 31008402; PMCID: PMC6458465.

Carvalho IC Mansur HS. Engineered 3D-Scaffolds of photocrosslinked chitosan gelatin hydrogel hybrids for chronic wound dressings and regeneration. *Mater Sci Eng: C*. 2017;1:690-05. doi:10.1016/j.msec.2017.04.126.

Cohen S M, De Vos W, Leermakers F. Why surfaces modified by flexible polymers often have a finite contact angle for good solvents. *Langmuir*. 2006; 22(4):1722-28. doi:10.1021/la052720v.

Colantonio S, Rivers JK. Botanicals with dermatologic properties derived from first nations healing: Part 2-Plants and Algae. *J Cutan Med Surg*. 2017;21(4):299-07. doi: 10.1177/1203475416683390. Epub 2016 Dec 19. PMID: 28300437.

Cronstein BN. Interleukin-6—a key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2007;65(1):S11–S15.

Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Lee KY. Antibacterial activity of Sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *J Microbiol Biotechnol*. 2007;17(5): 858-64. PubMed PMID: 18051310.

Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:629–41. doi:10.1038/nrmicro2200.

Chang J, Liu W, Han B, Peng S, He B, Gu Z. Investigation of the skin repair and healing mechanism of N-carboxymethyl chitosan in second-degree burn wounds. *Wound Repair Regen*. 2013;21(1):113-21. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00859.x. Epub 2012 Nov 5. PMID: 23126571.

Chang W, Bai J, Tian S, Ma M, Li W, Yin Y, et al. Autophagy protects gastric mucosal epithelial cells from ethanol-induced oxidative damage via mTOR signaling pathway. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(10):1025-33. doi:10.1177/1535370216686221.

Chatelet C, Damour O, Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. 2001;22:261–68. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00183-6.

Chen CY, Cheng KC, Chang AY, Lin YT, Hseu YC, Wang HM. 10-Shogaol, an antioxidant from *Zingiber officinale* for skin cell proliferation and migration enhancer. *Int. J Mol Sci*. 2012;13:1762-77. doi:10.3390/ijms13021762.

Chen X, Fu W, Cao X, Jiang H, Che X, Xu X, et al. Peptide SIKVAV-modified chitosan hydrogels promote skin wound healing by accelerating angiogenesis and regulating cytokine secretion. *Am J Transl Res*. 2018;10(12):4258-268. PMID: 30662668; PMCID: PMC6325526.

D'Souza SP, Chavannavar SV, Kanchanashri B, Niveditha SB. Pharmaceutical perspectives of spices and condiments as alternative antimicrobial remedy. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;22(4):1002–10. doi:10.1177/2156587217703214.

Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotech*. 2012;23:174-81. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007.

Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003;24(24):4337-51. doi:10.1016/s0142-9612(03)00340-5.

Ebeling S, Naumann K, Pollok S, Wardecki T, Vidal-y-Sy S, Nascimento JM, et al. From a traditional medicinal plant to a rational drug: understanding the clinically proven wound healing efficacy of Birch Bark extract. *PLoS ONE*. 2014;9(1):86-147. doi:10.1371/journal.pone.0086147.

Eskandarinia A, Kefayat A, Agheb M, Rafienia M, Amini Baghbadorani M, Navid S, et al. A novel bilayer wound dressing composed of a dense polyurethane/Propolis membrane and a biodegradable polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffold. *Sci Rep*. 2020;10(1):3063. doi: 10.1038/s41598-020-59931-2. PMID: 32080256; PMCID: PMC7033255.

Eslami H, Ariamanesh N, Ariamanesh A, Kafil H S. Synergistic effect of Honey and Azarian Propolis on oral microorganisms: an *in vitro* study. *J Adv Oral Res*. 2016;7(3):31-6.

European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Identifying criteria for wound infection. London: MEP Ltd, 2005.

Ewnetu Y, Lemma W, Birhane N. Synergetic antimicrobial effects of mixtures of ethiopian honeys and ginger powder extracts on standard and resistant clinical bacteria isolates. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;1-8. doi: 10.1155/2014/562804.

Fahimi S, Abdollahi M, Mortazavi SA, Hajimehdipoor H, Abdolghaffari AH, Rezvanfar MA. Wound healing activity of a traditionally used poly herbal product in a burn wound model in rats, iran red crescente. *Med J*. 2015;17(9):e19960. doi:10.5812/ircmj.19960.

Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. *PLoS One*. 2015;10(2):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0118431.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:662–68. doi: 10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3.

Fernández-Agulló A, Pereira E, Freire MS, Valentão P, Andradec PB, González-Álvarez J. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Ind Crop Prod*. 2013;(42):126–32. doi:10.1016/j.indcrop.2012.05.021.

Fratini F, Mancini S, Turchi B, Friscia E, Pistelli L, Giusti G, et al. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol Res*. 2017;195:11-7. doi: 10.1016/j.micres.2016.11.005. Epub 2016 Nov 18. PMID: 28024521.

Gaddum JH, Hameed KA, Hathaway DE, Stephens FF. Quantitative studies on antagonists for 5-hydroxytryptamine. *Q J Exp Physiol*. 1955;40:49–74. doi:10.1113/expphysiol.1955.sp001097.

Ge J, Cui Y, Yan Y, Jiang W. The effect of structure on pervaporation of chitosan membrane. *J Membr Sci*. 2000;165:75–81. doi:10.1016/s0376-7388(99)00228-8.

Gentil M, Pereira JV, Sousa YTCS, Pietro R, Neto MDS, Vansan LP, et al. *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of *Arctium lappa* as a phytotherapeutic agent used in intracanal dressings. *Phytother Res*. 2006;20:184-86. doi: 10.1002/ptr.1829.

Gomes RC, Brandino HE, Sousa NTA, Santos MF, Martinez R, Guirro RRJ. Polarized currents inhibit in vitro growth of bacteria colonizing cutaneous ulcers. *Wound Rep Reg*. 2015;(23):403–11. doi:10.1111/wrr.12296.

Gopalan Nair K, Dufresne A. Crab shell chitin whisker reinforced natural rubber nanocomposites. 1. Processing and swelling behavior. *Biomacromolecules*. 2003;4(3):657-65. doi:10.1021/bm020127b.

Gordon A, Kozin ED, Keswani SG, Vaikunth SS, Katz AB, Zoltick PW, et al. Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. *Wound Repair Regen*. 2008;16:70–9. doi:10.1111/j.1524-475x.2007.00326.x.

Gull I, Saeed M, Shaukat H, Aslam SM, Samra Z, Athar AM. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012;11:8. doi: 10.1186/1476-0711-11-8.

Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov*. 2002;7(10):569-79. doi:10.1016/s1359-6446(02)02255-9.

Guahk GH, Ha SK, Jung HS, Kang C, Kim CH, Kim YB, et al. Zingiber officinale protects HaCaT cells and C57BL/6 mice from ultraviolet B-Induced Inflammation. *J Med Food*. 2010;13(3):673–80. doi: 10.1089/jmf.2009.1239.

Graves N, Zheng H. The prevalence and incidence of chronic wounds: a literature review. *Wound Practice and Research*. 2014;22(1):4–19.
Availability: <<https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=272162994803134;res=IELIAC>> ISSN: 1837-6304. [cited 25 Nov 20].

Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*. 2003;13(5):264–69. doi:10.1016/s0962-8924(03)00057-6.

Haag NL, Velk KK, Wu C. Potential antibacterial targets in bacterial central metabolism. *Int J Adv Life Sci*. 2012;4:21–32. PMCID: PMC3800682
NIHMSID: NIHMS474178 PMID: 24151543.

Hadwiger LA, Kendra DF, Fristensky BW, Wagoner W. Chitin in nature and technology; Muzzarelli, RAA, Jeuniaux C, Gooday CW. Eds.; Plenum Press: New York, NY, USA. 1986; pp. 209–14.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990;265(3):621–36. doi: 10.1042/bj2650621.

Hopkins AL, Bickerton GR, Carruthers IM, Boyer SK, Rubin H, Overington JP. Rapid analysis of pharmacology for infectious diseases. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(10):1292–300. doi: 10.2174/156802611795429130. PMID: 21401504; PMCID: PMC3182413.

Huang M, Yang D, Xiang M, Wang J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail Ver*. 2015;20:25–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.076>.

Hsu SH, Chen CW, Hung KC, Tsai YC, Li S. Thermo-responsive polyurethane hydrogels based on poly (ε-caprolactone) diol and amphiphilic polylactide-poly(ethylene glycol) block copolymers. *Polymers*. 2016;8(7):252. doi:10.3390/polym8070252.

Ifuku S. Chitin and chitosan nanofibers: Preparation and chemical modifications. *molecules*. 2014;19(11):18367–380. doi:10.3390/molecules191118367.

Joshan DS, Singhb SK. Investigational study of Juglans regia extract and quercetin against photoaging. *Biomed Aging Pathol*. 2013;3:193–200. doi:10.1016/j.biomag.2013.08.005.

Jung SM, Kim DS, Ju JH, Shin HS. Assessment of Spirulina-PCL nanofiber for the regeneration of dermal fibroblast layers. *In Vitro Cell. Dev Biol—Animal*. 2013; 49:27–33. doi 10.1007/s11626-012-9568-y.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994;368(6469):339-42. doi: 10.1038/368339a0. PMID: 8127368.

Kushner I. C-reactive protein in rheumatology. *Arthritis Rheum*. 1991;34(8):1065–68. doi: 10.1002/art.1780340819.

Kushner I, Rzewnicki DL. The acute phase response: general aspects. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1994;8(3):513–30. doi: 10.1016/s0950-3579(05)80113-x.

Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali SM, et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*. 2009;14(2):586-97. doi: 10.3390/molecules14020586. PMID: 19214149; PMCID: PMC6253777.

Karapetsas A, Voulgaridou GP, Konialis M, Tsochantaridis I, Kynigopoulos S, Lambropoulou M, et al. Propolis extracts inhibit uv-induced photodamage in human experimental in vitro skin models. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8(5):125. doi: 10.3390/antiox8050125.

Kent RM, Fitzgerald GF, Hill C, Stanton C, Ross RP. Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*. 2015; 7(2):1217-44. doi: 10.3390/nu7021217.

King A, Balaji S, Le LD, Crombleholme TM, Keswani SG. Regenerative wound healing: the role of Interleukin-10. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(4):315-23. doi:10.1089/wound.2013.0461.

Kumar R, Majeti NV, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Synthesis of a chitosan-dendrimer hybrid and its biodegradation. *Chem Rev*. 2004;104:6017–84.

Kirker KR, James GA. In vitro studies evaluating the effects of biofilms on wound-healing cells: a review. *APMIS*. 2017;125:344–52. doi 10.1111/apm.12678.

Khodabakhshia D, Eskandariniaa A, Kefayat A, Rafienia M, Navidd S, Karbasi S, et al. In vitro and in vivo performance of a Propolis-coated polyurethane wound dressing with high porosity and antibacterial efficacy. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019;178:177–84. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.010>.

Kwok DY, Neumann AW. Contact angle measurement and contact angle interpretation *Adv. Colloid Interface Sci*. 1999;81:167-249. doi:10.1016/s0001-8686(98)00087-6.

Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, et al. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 2007;8:2 533-41. doi:10.1021/bm070014y.

Leal PF, Kfoury MB, Alexandre FC, Fagundes FHR, Prado JM, Toyama MH, et al. Brazilian Ginseng extraction via LPSE and SFE: Global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity. *J Supercrit Fluids*. 2010;54:38–45. doi:10.1016/j.supflu.2010.03.007.

Leijten J, Seo J, Yue K, Trujillo-de Santiago G, Tamayol A, Ruiz-Esparza GU, et al. Spatially and temporally controlled hydrogels for tissue engineering. *Mater Sci Eng R Rep*. 2017;119:1-35. doi:10.1016/j.mser.2017.07.001.

Li C, Ren S, Dai Y, Tian F, Wang X, Zhou S, et al. Efficacy, pharmacokinetics, and biodistribution of thermosensitive chitosan/ β -glycerophosphate hydrogel loaded with docetaxel. *Aaps Pharmscitech*. 2014;15(2):417-24. doi: 10.1208/s12249-014-0077-z.

Li Z, Ye E, David, Lakshminarayanan R, Loh XJ. Recent Advances of Using Hybrid Nanocarriers in Remotely Controlled Therapeutic Delivery. *Small*. 2016;12(35):4782-806. doi: 10.1002/sml.201601129. Epub 2016 Aug 2. PMID: 27482950.

Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol*. 2003;73(6):713-21. doi: 10.1189/jlb.0802397.

Loh EYX, Fauzi MB, Ng MH, Ng PY, Ng SF, Ariffin H, et al. Cellular and molecular interaction of Human Dermal Fibroblasts with bacterial nanocellulose composite hydrogel for tissue regeneration. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018;10(46):39532-543. doi:10.1021/acsami.8b16645.

Longhini R, Raksa SM, Oliveira AC, Svidzinski TI, Franco SL. Obtenção de extratos de Própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(3):388-95. <https://doi.org/10.1590/S0102695X2007000300015>.

López E, Balcázar MMJ, Ortiz A, Melo M, Parrales R, Delgado T. Antimicrobial activity of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Am J Plant Sci*. 2017;8:1511-24. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.87104>.

López-Romero D, Izquierdo-Vega JA, Morales-González JA, Madrigal-Bujaidar E, Chamorro-Cevallos G, Sánchez-Gutiérrez M, et al. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: Plants, Vegetables, and Natural Resin. *Nutrients*. 2018;10(12):1954. doi: 10.3390/nu10121954. PMID: 30544726; PMCID: PMC6316078.

Lowry OH, Rsebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75. PMID: 14907713.

Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(3):447-54. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>.

Macha IJ, Ben-Nissan B, Vilchevskaya EN, Abali BE, Mueller WH, Rickert W. Drug delivery from polymer-based nanopharmaceuticals--An experimental study complemented by a simulation of selected diffusion processes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:37. doi: 10.3389/fbioe.2019.00037.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Camargo CH, Jorge AO. Effect of *Zingiber officinale* and Propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(1):25-31. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7757201302129>.

Majeti NV, Kumar R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46:1–27. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9).

Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol.* 2005;32(6):7–15. doi: 10.1111/j.1600-051x.2005.00790.x=.

Munkholm K, Brauner JV, Kessing LV, Vinberg M. Cytokines in bipolar disorder vs. healthy control subjects: a systematic review and meta-analysis. *J Psychiatr Res.* 2013;47:1119-33. doi:10.1016/j.jpsychires.2013.05.018.

Murakami Y, Maeda M. DNA-responsive hydrogels that can shrink or swell. *Biomacromolecules.* 2005;6(6):2927-29. doi: 10.1021/bm0504330.

Nagahama H, Maeda H, Kashiki T, Jayakumar R, Furuie T, Tamura H. Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. *Carbohydr Polym.* 2009;76(2):255-60. doi:10.1016/j.carbpol.2008.10.015.

Nagarathna P, Johnson Wesley M, Sriram Reddy P, Reena K. Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2013;22(1):236–43. ISSN 0976 – 044X

Namivandi-Zangeneh R, Sadrearhami Z, Dutta D, Willcox M, Wong EH, Boyer C. Synergy between synthetic antimicrobial polymer and antibiotics: A promising platform to combat multidrug-resistant bacteria. *ACS Infect Dis.* 2019;5:1357–65. doi:10.1021/acsinfecdis.9b00049.

Nawaz S, Khan S, Farooq U, Haider MS, Ranjha NM, Rasul A, et al. Biocompatible hydrogels for the controlled delivery of anti-hypertensive agent: development, characterization and in vitro evaluation. *Des Monomers Polym.* 2018;21(1):18–32. doi:10.1080/15685551.2018.1445416.

Nostro A, Cellini AL, Di Bartolomeo S, Cannatelli MA, Di Campli E, Procopio F, et al. Effects of Combining extracts (from Propolis or *Zingiber officinale*) with Clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytother Res.* 2006;20:187–90. doi: 10.1002/ptr.1830.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1):1. doi: 10.1093/jac/dkg301.

Ogodo AC, Ekeleme UG. In-vitro antibacterial activity of garlic cloves and ginger rhizomes on food-borne pathogens. *Int J Basic App Sci.* 2013;2(4):387–92. doi:10.14419/ijbas.v2i4.1347.

Ohe T. Antigenotoxic activities of chitin and chitosan as assayed by sister chromatid exchange. *Sci Total Environ.* 1996;181:1–5. doi:10.1016/0048-9697(95)04949-5.

Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and *checkerboard* methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):140-43. doi:10.1128/jcm.43.1.140-143.2005.

Pan H, Jiang HL, Chen WL. Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide. *Biomater.* 2006;27(17):3209-220. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.032>.

Pattanayak SP, Sunita P. Wound healing, antimicrobial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh. *J Ethnopharmacol.* 2008;120:241–47. doi: 10.1016/j.jep.2008.08.019.

Peranteau WH, Zhang L, Muvarak N, Badillo AT, Radu A, Zoltick PW, et al. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *J Invest Dermatol.* 2008;128(7):1852–60. doi:10.1038/sj.jid.5701232.

Pereira JV, Bergamo DCB, Pereira JO, França SC, Pietro RCLR e Silva-Sousa YTC. Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Braz Dent J.* 2005;16(3):192-96. doi:10.1590/s0103-64402005000300004.

Pereira RF, Bártolo PJ. Traditional therapies for skin wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2016;5(5):208–29. doi: 10.1089/wound.2013.0506.

Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012;20(5): 647–57. doi:10.1111/j.1524-475x.2012.00836.x.

Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv Mater.* 2006;18(11): 1345–360. doi:10.1002/adma.200501612.

Pithayanukul P, Tubprasert J, Wuthi-Udomlert M. In Vitro antimicrobial activity of *Zingiber cassumunar* (Plai) oil and a 5% Plai oil gel. *Phytother Res.* 2007;21(2):164–9. doi: 10.1002/ptr.2048.

Radulovic NS, Blagojevic PD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovic NM. Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem.* 2013;20(7):932-52. doi:10.2174/092986713805219136.

Rae K E, Isbel S, Upton D. Support surfaces for the treatment and prevention of pressure ulcers: a systematic literature review. *J wound care*. 2018;27(8):467-74. doi:10.12968/jowc.2018.27.8.467.

Paula-Ramos L, da Rocha Santos CE, Reis Mello DC, Nishiyama LT, De Oliveira FE, Back Brito GN, et al. *Klebsiella pneumoniae* planktonic and biofilm reduction by different plant extracts: *in vitro* study. *Sci World J*. 2016;2016:3521413. doi: 10.1155/2016/3521413. Epub 2016 Nov 28. PMID: 28004034; PMCID: PMC5149674.

Rampogu S, Baek A, Gajula RG, Zeb A, Bavi RS, Kumar R, et al. *Ginger (Zingiber officinale)* phytochemicals—gingerenone-A and shogaol inhibit SaHPPK: molecular docking, molecular dynamics simulations and *in vitro* approaches. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2018;17:16. <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0266-9>.

^a Ranfaing J, Duniach-Remy C, Louis L, Lavigne JP, Sotto A. Propolis potentiates the effect of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) against the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2018a; 8(1):10706. doi:10.1038/s41598-018-29082-6.

^b Ranfaing J, Duniach-Remy C, Lavigne JP, Sotto A. Propolis potentiates the effect of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) in reducing the motility and the biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2018b;13(8):e0202609. doi:10.1371/journal.pone.0202609.

Rani A, Jain S, Dureja P, Kumar R, Kumar A. Synergistic interaction between synthetic and natural products: a promising tool for the development of environmentally safe potent antimicrobial agents. *World Appl Sci J*. 2009;5(Spe Issue):59-63.

Rather MA, Dar BA, Dar MY, Wani BA, Shah WA, Bhat BA, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine*. 2012;19(13):1185-90. doi: 10.1016/j.phymed.2012.07.018. Epub 2012 Aug 27. PMID: 22951389.

Regueira Neto MS, Tintino SR, da Silva ARP, Costa MS, Boligon AA, Matias EFF, et al. Seasonal variation of Brazilian red Propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol*. 2017;107:572-80. doi:10.1016/j.fct.2017.03.052.

Rialita T, Nurhadi B, Puteri RD. Characteristics of microcapsule of red ginger (*Zingiberofficinale* var. *Rubrum*) essential oil produced from different Arabic gum ratios on antimicrobial activity toward *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Prop*. 2018;21(1): 2500-508. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1528455>.

Rice JJ, Martino MM, De Laporte L, Tortelli F, Briquez PS, Hubbell JA. Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials. *Adv Healthc Mater*. 2013;2(1): 57–71. doi:10.1002/adhm.201200197.

Rohl J, Zaharia A, Rudolph M & Murray R Z. The role of inflammation in cutaneous repair. *Wound Repair Regen.* 2015;23(1):8-15.

Availability: <<https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=054990028598679;res=IELHEA>> ISSN: 1837-6304. [cited 25 Nov 20].

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings M K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* 2006;212(1):28–50. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00420.x.

Sabir A. The healing actions of propolis on direct pulp capping treatment: A review. *J Dentomax Sci.* 2016;1:186. doi 10.15562/jdmfs.v1i1.145.

Salas AL, Uriburu CFM, Zampini IC, Arias M, Moreno N, Santillán Deiú MI, et al. Hydroalcoholic gel with Argentine propolis: the potential for antimicrobial and antioxidant activities, stability evaluation, and in vitro phenolic release. *J Apic Res.* 2020;1–9. doi:10.1080/00218839.2020.179079.

Santos HF, Campos JF, Santos CM, Balestieri JB, Silva DB, Carollo CA, et al. Chemical profile and antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic and antimicrobial activities of geopropolis from the stingless bee *Melipona orbignyi*. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(5):953. doi:10.3390/ijms18050953.

Santos PBRE, Ávila DS, Ramos LDP, Yu AR, Santos CER, Berretta AB, et al. Effects of Brazilian green propolis extract on planktonic cells and biofilms of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling.* 2020;36(7):834-45. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1823972>.

Sargın SA, Akçicek E, Selvi S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alaşehir (Manisa) in Turkey. *J Ethnopharmacol.* 2013;150(3):860–74. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.040.

Severin T, Müller B, Giese G, Uhl B, Wolf B, Hauschildt S, et al. pH-dependent LAK cell cytotoxicity. *Tumor Biol.* 1994;15(5):304-10. <https://doi.org/10.1159/000217905>.

Song K, Yan X, Zhang W, Zhang Y, Wang Y, Liu T. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells in vitro culture and in vivo differentiation in a temperature-sensitive chitosan/ β -glycerophosphate/collagen hybrid hydrogel. *Mater Sci Eng C.* 2017;70:231-40. doi:10.1016/j.msec.2016.08.085.

Sukumaran V, Park SC, Giri SS. Role of dietary ginger *Zingiber officinale* in improving growth performances and immune functions of *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Shellfish Immun.* 2016;57:362–70. doi:10.1016/j.fsi.2016.08.056.

Sharma PK, Singh V, Ali M. Chemical composition and antimicrobial activity of fresh rhizome essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe. *Pharmacogn J.* 2016;8:185–90. doi:10.5530/pj.2016.3.3.

Shi G, Shaw G, Liang YH, Subburaman P, Li Y, Wu Y, et al. Bisubstrate analogue inhibitors of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase: new design with improved properties. *Bioorg Med Chem*. 2012;20(1):47–57. doi:10.1016/j.bmc.2011.11.032.

Shi JH, Guan H, Shi S, Cai WX, Bai XZ, Hu XL, et al. Protection against TGF- β 1-induced fibrosis effects of IL-10 on dermal fibroblasts and its potential therapeutics for the reduction of skin scarring. *Arch Dermatol Res*. 2013;305(4):341–52. doi 10.1007/s00403-013-1314-0.

Słoczyńska K, Powroźnik B, Pękala E, Waszkielewicz AM. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. *J Appl Genet*. 2014;55(2):273–85. doi:10.1007/s13353-014-0198-9.

Spinks GM, Lee CK, Wallace GG, Kim SI, Kim SJ. Swelling behavior of chitosan hydrogels in ionic liquid– water binary systems. *Langmuir*. 2006;22(22):9375–79. doi:10.1021/la061586r.

Stadnyk B, Mordoch E, Martin D. Factors in facilitating an organisational culture to prevent pressure ulcers among older adults in health-care facilities. *J wound Care*. 2018;27(Sup 7):s4-s10. doi:10.12968/jowc.2018.27.sup7.s4.

Stoyanova A, Konakchiev A, Damyanova S, Stoilova I, Suu PT. Composition and antimicrobial activity of ginger essential oil from Vietnam. *J Essent Oil-Bear Plants*. 2006;9(1):93–8. doi:10.1080/0972060x.2006.10643478.

Sziks E, Pap D, Lippai R, Béres NJ, Fekete A, Szabó A J, et al. Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family. *Mediators Inflamm*. 2015; 1-15. doi:10.1155/2015/764641.

Tajbakhsh M, Soleimani N. Evaluation of the bactericidal effects of *Zingiber officinale*, *Aloysia citrodora* and *Artemisia dracuncululus* on the survival of standard gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Jorjani Biomed J*. 2018;6(1):22-32. doi: 10.29252/jorjanibiomedj.6.1.22.

Teijón C, Olmo R, Blanco M D, Teijón J M, Romero A. Effect of the crosslinking degree and the nickel salt load on the thermal decomposition of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels and on the metal release from them. *J Colloid Interface Sci*. 2006;295(2):393-400. doi:10.1016/j.jcis.2005.10.015.

Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today*. 1997;18(9):428–32. doi:10.1016/s0167-5699(97):01103-1.

Tormos CJ, Abraham C, Madihally SV. Improving the stability of chitosan–gelatin-based hydrogels for cell delivery using transglutaminase and controlled release of doxycycline. *Drug Deliv Transl Res*. 2015; 5(6):575–84. doi 10.1007/s13346-015-0258-7.

Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT, Tomazzoli MM, Maraschin M, Mello CF, et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. *Braz J Med Biol Res.* 2018;51(6):e7118. doi: 10.1590/1414-431x20187118. Epub 2018 May 21. PMID: 29791598; PMCID: PMC6002130.

Tkachenko O, Karas JA. Standardizing an *in vitro* procedure for the evaluation of the antimicrobial activity of wound dressings and the assessment of three wound dressings. *J Antimicrob Chemoth.* 2012;67(7):1697–700. doi:10.1093/jac/dks110.

Ueno H, Nakamura F, Murakami M, Okumura M, Fujinag T. Evaluation effect of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials.* 2001;22(15):2125–130. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00401-4.

Ušjak D, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.* 2019; 131:186-96. doi:10.1016/j.micpath.2019.04.015.

Vadhana P, Singh BR, Bharadwaj M, Singh SV. Emergence of Herbal Antimicrobial Drug Resistance in Clinical Bacterial Isolates. *Pharm Anal Acta.* 2015;6-10. doi: 10.4172/2153-2435.1000434.

Vashist A, Ahmad S. Hydrogels in tissue engineering: scope and applications. *Curr Pharm Biotechnol.* 2015;16(7):606-20. doi: 10.2174/138920101607150427111651.

Wang L, Stegemann JP. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β -glycerophosphate for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(14):3976-85. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.131.

Wang LS, Chung JE, Kurisawa M. Controlling fibroblast proliferation with dimensionality-specific response by stiffness of injectable gelatin hydrogels. *J Biomater Sci.* 2012;23(14):1793-1806. doi:10.1163/156856211x598193.

Wang Q, Chen D. Synthesis and characterization of a chitosan based nanocomposite injectable hydrogel. *Carbohydr Polym.* 2016;136:1228-37. doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.040.

Warnke PH, Becker ST, Podschun R, Sivananthan S, Springer IN, et al. The battle against multi-resistant strains: renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. *J Cranio- Maxillofacial Surg.* 2009;37(7):392-97. doi:10.1016/j.jcms.2009.03.017.

Weinstein-Opppenheimer CR, Brown DI, Coloma R, Morales P, Reyna M, Díaz MJ, et al. Design of a hybrid biomaterial for tissue engineering: Biopolymer-scaffold integrated with an autologous hydrogel carrying mesenchymal stem-cells. *Mater Sci Eng: C.* 2017;821-30. doi:10.1016/j.msec.2017.05.116.

Wiegand C, Winter D, Hipler UC. Molecular-weight-dependent toxic effects of chitosans on the human keratinocyte cell line HaCaT. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2010;23(3):164–70. doi: 10.1159/000276996.

Xiao B, Shi G, Gao J, Blaszczyk J, Liu Q, Ji X, et al. Unusual conformational changes in 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase as revealed by x-ray crystallography and NMR. *J Biol Chem.* 2001;276(43):40274–81. doi:10.1074/jbc.m103837200.

Yan XZ, Van Den Beucken JJ, Cai X, Yu N, Jansen JA, Yang F. Periodontal tissue regeneration using enzymatically solidified chitosan hydrogels with or without cell loading. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(5-6):1066-76. doi:10.1089/ten.tea.2014.0319.

Yang HL, Lee CL, Korivi M, Liao JW, Rajendran P, Wu JJ, et al. Zerumbone protects human skin keratinocytes against UVA-irradiated damages through Nrf2 induction. *Biochem Pharmacol.* 2008;148:130–46. doi:10.1016/j.bcp.2017.12.014.

Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 2017;57:1-25. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.036.

Yang SZ, Cao SNB. *The divine farmer's materia medica: a translation of the shen nong ben cao.* Costa Mesa, CA: Blue Poppy Press. 1998.