



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

ALANE PEREIRA ALVES

Hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis na cicatrização de feridas cutâneas em porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*)

Patos/PB

2022

ALANE PEREIRA ALVES

Hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis na cicatrização de feridas cutâneas em porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência e Saúde Animal

Orientador: Professor Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá

Patos/PB

2022

A474h

Alves, Alane Pereira

Hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis na cicatrização de feridas cutâneas em porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) / Alane Pereira Alves. – Patos, 2022.

61 f.

Orientador: Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Doutorado em Ciência e Saúde Animal.

1. Compostos fenólicos. 2. Regeneração. 3. Engenharia tecidual. 4. Queimaduras. I. Sá, Marcelo Jorge Cavalcanti de, *orient.* II. Título.

CDU 619:616-089



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA
GRANDEPOS-GRADUACAO EM CIENCIA
E SAUDE ANIMAL

Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

ALANE PEREIRA ALVES

**HIDROGEL À BASE DE ÁLCOOL POLIVINÍLICO (PVA) ASSOCIADO À PRÓPOLIS NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM PORQUINHOS-DA-
ÍNDIA (*Cavia porcellus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência e Saúde Animal.

Aprovada em: 31/08/2022

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá (Orientador -
PPGCSA/UFCG) Prof. Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
(Examinador Externo - UFCG) Prof. Dr. Ricardo Barbosa de Lucena
(Examinador Interno - UFCG)
Profa. Dra. Fabrícia Geovânia Fernandes Filgueira (Examinadora Externa -
IFPB) Prof. Dr. Luiz Eduardo Carvalho Buquera (Examinador Externo - UFPB)

OBSERVAÇÕES:

- 1 - Por não possuir cadastro como usuário externo no SEI, a examinadora Fabrícia Geovânia Fernandes Filgueira receberá cópia do presente documento e dará ciência e aprovação dos termos por e-mail.
- 2 - Os examinadores internos signatários certificam que o examinador externo acima identificado participou da defesa da tese e tomou conhecimento do teor deste documento.



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Barbosa de Lucena, Usuário Externo**, em 31/08/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rossemberg Cardoso Barbosa, Usuário Externo**, em

31/08/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **LUIZ EDUARDO CARVALHO BUQUERA**, Usuário **Externo**, em 31/08/2022, às 22:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARCELO JORGE CAVALCANTI DE SA**, **PROFESSOR(A) DOMAGISTERIO SUPERIOR**, em 02/09/2022, às 10:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **2631937** e o código CRC **E249F3F1**.

À minha mãe, Socorro Pereira, que sempre acreditou nos meus sonhos, me incentivando e fazendo o possível por mim. Obrigada por tudo, amo-te hoje e sempre!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, a força que me faz seguir em frente todos os dias. Obrigada por me conceder saúde, proteção, perseverança, paciência e sabedoria nos momentos difíceis.

À minha mãe, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, me orientando com sua sabedoria, obrigada por ser essa mãe guerreira, pela qual tenho muito orgulho.

Ao meu noivo, Marcelo, obrigada por ser esse companheiro que me incentiva a lutar pelos meus objetivos, obrigada pela paciência e compreensão por vários momentos em que me distanciei em virtude das ocupações da tese, obrigada por tudo, amo-te!

À minha família e amigos por me apoiarem sempre.

Aos colegas da pós-graduação: Gracineide, Sóstenes, Lylian, Rodrigo, e aos alunos Kamila e Emanuel que me ajudaram na execução do experimento, vocês foram fundamentais!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo, obrigada por tudo!

À Gabriel, Bor Cheen e todos da Irlanda que produziram o material para o experimento, obrigada por toda contribuição.

Ao professor Valdemiro e seu orientador Alluanan, obrigada pelo trabalho realizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande, pela oportunidade.

À FAPESQ-Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba, pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE GRÁFICOS.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS	18
2. CAPÍTULO I: Produção e análise de citotoxicidade in vitro do hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis para produção de curativos.....	20
RESUMO	21
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS	31
3. CAPÍTULO II: Caracterização físico-química do hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis através dos métodos de eletrofiação e congelamento/descongelamento	33
RESUMO	34
ABSTRACT	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1 Condutividade	36
2.2 Análise dos espectros de absorção na região UV-Vís	36
2.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	36

2.4	Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	36
2.5	Ângulo de contato com água.....	36
2.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	37
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1	Condutividade.....	37
3.2	Espectroscopia ultravioleta visível (UV).....	37
3.3	Espectroscopia infravermelho de transformada de Fourier (FTIR).....	38
3.4	Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	38
3.5	Ângulo de contato com água.....	39
3.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	40
4.	CONCLUSÃO.....	41
5.	REFERÊNCIAS	41
4.	CAPÍTULO III: Curativos de hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis e hidrocolóide na cicatrização cutânea de <i>Cavia porcellus</i>	43
1.	INTRODUÇÃO.....	45
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
	56
4.	CONCLUSÕES	56
5.	REFERÊNCIAS	56
	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	58
	APÊNDICE A.....	60

RESUMO

Este estudo teve como objetivos produzir hidrogéis à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis pelo método de eletrofição e eletrofição mais ciclos de congelamento e descongelamento, bem como a realização de teste de citotoxicidade *in vitro* nos hidrogéis, caracterização físico-química e avaliação da cicatrização cutânea em *Cavia porcellus*, comparando o processo de cicatrização dos hidrogéis entre si, e com o curativo de hidrocolóide. No capítulo I, os hidrogéis foram produzidos e submetidos à análise de citotoxicidade *in vitro* através do teste de MTT para avaliação da sua viabilidade celular. Foi visto que os hidrogéis de PVA/própolis nas concentrações produzidas e avaliadas não foram citotóxicas, estando aptas a serem avaliadas em estudos *in vivo*. No capítulo II os hidrogéis foram eletrofiados e depois submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento, posteriormente realizou-se a caracterização físico-química, analisando a condutividade elétrica, ângulo de absorção de água, absorbância, FTIR, análise por calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica por varredura. O método de produção foi eficiente gerando características físico-química ideais para hidrogéis usados como curativos. No capítulo III foram utilizados dezoito *Cavia porcellus* (porquinhos-da-índia) distribuídos em três grupos, (HE) curativos de hidrogel eletrofiados, (HC) curativos de hidrogel congelados/descongelados e (H) curativos de hidrocolóide, com seis animais em cada grupo. Com os animais sob efeito de anestesia geral procedeu-se antissepsia da região dorsal, e posteriormente demarcou-se um defeito cutâneo circular de 2 cm que foi incisado, removendo a pele até o músculo panículo carnosos. A cicatrização das feridas foi avaliada quanto aos aspectos macroscópicos e histopatológicos. Na avaliação macroscópica a presença de edema, inflamação e exsudato foi mais acentuada nas feridas com curativos de hidrocolóide. Não houve diferença estatística entre os dois tipos de hidrogéis utilizados. Na avaliação histopatológica, ambos os curativos de hidrogéis se mostraram semelhantes, contudo nas feridas que foram utilizados curativos de hidrocolóides houve intensa reação inflamatória, discreta presença de anexos cutâneos e presença de células gigantes. Concluiu-se que os dois tipos de curativos de hidrogéis eletrofiados produzidos se mostraram mais eficazes que os curativos de hidrocolóides.

Palavras-chave: compostos fenólicos, regeneração, engenharia tecidual, queimadura.

ABSTRACT

This study aimed to produce hydrogels based on polyvinyl alcohol (PVA) associated with propolis by the electrospinning and electrospinning method plus freezing and thawing cycles, as well as performing an in vitro cytotoxicity test on the hydrogels, physicochemical characterization and evaluation of skin healing in *Cavia porcellus*, comparing the healing process of hydrogels with each other, and with the hydrocolloid dressing. In chapter I, the hydrogels were produced and submitted to in vitro cytotoxicity analysis through the MTT test to evaluate their cell viability. It was seen that the PVA/propolis hydrogels at the concentrations produced and evaluated were not cytotoxic, being able to be evaluated in in vivo studies. In chapter II, the hydrogels were electrospun and then subjected to freezing and thawing cycles, later the physical-chemical characterization was carried out, analyzing the electrical conductivity, water absorption angle, absorbance, FTIR, analysis by differential exploratory calorimetry and electron microscopy. per sweep. The production method was efficient, generating ideal physical-chemical characteristics for hydrogels used as dressings. In chapter III, eighteen *Cavia porcellus* (guinea pigs) were distributed in three groups, (HE) electrospun hydrogel dressings, (HC) frozen/thawed hydrogel dressings and (H) hydrocolloid dressings, with six animals in each group. With the animals under general anesthesia, antisepsis of the dorsal region was performed, and a 2 cm circular skin defect was demarcated, which was incised, removing the skin up to the panniculus carnosus muscle. Wound healing was evaluated in terms of macroscopic and histopathological aspects. In the macroscopic evaluation, the presence of edema, inflammation and exudate was more pronounced in wounds with hydrocolloid dressings. There was no statistical difference between the two types of hydrogels used. In the histopathological evaluation, both hydrogel dressings were similar, however, in the wounds that were used hydrocolloid dressings, there was an intense inflammatory reaction, discreet presence of skin appendages and presence of giant cells. It was concluded that the two types of electrospun hydrogel dressings produced were more effective than the hydrocolloid dressings.

Keywords: phenolic compounds, regeneration, tissue engineering, burns

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Hidrogel de PVA/própolis após eletrofiação24

CAPÍTULO II

Figura 1: As primeiras três imagens são capturadas pela câmera em 0, 17, 40 s e a última imagem são os ângulos de contato alterados durante 40s.39

Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura do hidrogel de 5% PVA: Própolis (7:3) imagem ampliada 1500x..... 40

CAPÍTULO III

Figura 1: Utilização do curativo em lesão cutânea em *Cavia porcellus*. 1-Curativo de hidrogel de PVA/própolis, 2-Demarcção do defeito cutâneo, 3-Incisão e ressecção de pele, 4-Implantação do curativo.....47

Figura 2: Evolução da cicatrização cutânea com a utilização do curativo de PVA/própolis pelo método de eletrofiação/congelamento e descongelamento, período de D0-D24.52

Figura 3: Evolução da cicatrização cutânea com a utilização do curativo de PVA/própolis pelo método de eletrofiação, período de D0-D21.....52

Figura 4: Evolução da cicatrização cutânea com a utilização do curativo de hidrocolóide, período D0-D24.53

Figura 5- Avaliação histopatológica do curativo de hidrocolóide (1) seta verde- discreta presença de anexos cutâneos (2) seta preta- plasmócitos, seta vermelha-células gigantes..... 55

Figura 6: (A) Avaliação histopatológica do curativo de hidrogel de PVA/própolis pelo método de eletrofiação (B) curativo de hidrogel de PVA/própolis pelo método de eletrofiação/congelamento e descongelamento. A e B (setas pretas)-glândulas sebáceas e folículos pilosos. A e B (seta vermelha)-faixa de tecido conjuntivo denso e fibroplasia, (setas verdes)-vasos sanguíneos).....56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Concentrações e volumes das soluções de própolis e PVA obtidas para confecção do hidrogel a ser submetido à análise de citotoxicidade <i>in vitro</i> para produção de curativos.....	23
Tabela 2. Resultados correspondentes da amostra 1 em diferentes soluções de concentração.	27
Tabela 3. Resultados correspondentes da amostra 2 em diferentes soluções de concentração.	28
Tabela 4. Resultados correspondentes da amostra 3 em diferentes soluções de concentração.	29

CAPÍTULO II

Tabela 1. Resumo das atribuições do FTIR.....	38
---	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Tempo de cicatrização das feridas cutâneas em porquinhos da índia, de acordo com o curativo utilizado: hidrogel de pva/própolis por eletrofiação e congelamento /descongelamento; hidrogel de pva/própolis por eletrofiação, e curativo de hidrocolóide.....	49
Tabela 2. Média e desvio padrão da área de cicatrização das feridas cutâneas nos momentos D0, D3, D6, D9, D12, D15, D18, D21 e D 24. Dos grupos (HC), (HE) e (H).....	50
Tabela 3: Média e desvio padrão dos escores de avaliação macroscópica das feridas cutâneas nos momentos D0, D3, D6, D9, D12, D15, D18. Dos grupos (HC), (HE) e (H).....	51
Tabela 4: Escores de avaliação histopatológica da cicatrização das feridas cutâneas em porquinhos da índia, de acordo com o curativo utilizado: membrana de pva/própolis por congelamento e descongelamento; membrana de pva/própolis por eletrofiação, e curativo de hidrocolóide	54

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I

Gráfico 1: Viabilidade celular das soluções de PVA/própolis, submetidas à variáveis concentrações de própolis pelo teste de MTT, para produção de curativos de hidrogel..... 26

CAPÍTULO II

Gráfico 1- A relação de Absorbância e Comprimento de Onda da solução do extrato de própolis..... 37

Gráfico 2: Distribuição do diâmetro da nanofibra de 5% PVA: própolis (7:3) nanofibra (direita)40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

MEV- microscopia eletrônica de varredura

MEC- matriz extracelular

PVA- álcool polivinílico

PCL-policaprolactona

BFGF- fator de crescimento fibroblástico básico

STB- soro fetal bovino

ANOVA-teste de análise de variância

cm- centímetros

°C- graus Celsius

DMEM- meio de Eagle modificado por Dulbecco

EDTA-ácido etileno Diamino tetra-acético

MG- miligrama

MTT- brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

RPM- rotação por minuto

ATR-FTIR: refletância total atenuada a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

MSCM-milisiemens por centímetros

DSC-calorimetria de varredura diferencial

WCA- ângulo de contato com água

1. INTRODUÇÃO GERAL

Uma ferida é descrita como uma agressão por um agente ao tecido vivo, essa agressão pode ser de origem física, mecânica, química ou por uma afecção clínica. A forma como ocorre a lesão ao tecido cutâneo é de grande importância, pois influencia diretamente na cicatrização da ferida, que pode ser por primeira ou segunda intenção (PERCIVAL, 2002).

O processo normal de cicatrização de feridas inclui uma atividade complexa que consiste em uma série de eventos como hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação da matriz extracelular (MEC). Esse processo é severamente desregulado em casos de condições fisiopatológicas, como a diabetes e de amplos ferimentos causados por queimaduras ou acidentes que resultam na perda da maioria dos tecidos da pele, que desse modo, não cicatriza (CLARK *et al.*, 2007; SEAVEY *et al.*, 2016; TAVAKOLI e KLAR, 2020).

Geralmente as feridas se classificam em duas categorias, feridas agudas e crônicas. As feridas agudas resultam de eventos traumáticos ou cirúrgicos que seguem um processo previsível e bem organizado envolvendo plaquetas, fibroblastos e queratinócitos. Em contra partida, as feridas crônicas apresentam inflamação prolongada, infecções frequentes, presença de biofilmes microbianos resistentes a drogas e falha das células dérmicas e epidérmicas em responder aos estímulos reparadores (MOHAMAD *et al.*, 2014; ANDREU *et al.*, 2015).

Existe grande dificuldade no tratamento de pacientes com feridas e queimaduras, entre os tipos de queimaduras, as de grau 2 e 3 são as mais complexas de se tratar, pois exigem curativos especializados (MOHAMAD *et al.*, 2014). Os curativos são uma forma de tratamento das feridas cutâneas e sua escolha decorre de fatores intrínsecos e extrínsecos. Esse tratamento é dinâmico e está relacionado com as fases de cicatrização da ferida. A escolha do curativo deve levar em consideração a natureza, localização e tamanho da ferida (FRANCO e GONÇALVES, 2008).

Os curativos úmidos são capazes de estimular a cicatrização tecidual quando comparados com os curativos secos, visto que, previnem a desidratação tecidual que leva à morte celular, aceleram a angiogênese, estimulam a epitelização e formação do tecido de granulação, facilitam a remoção de fibrina, diminuem a necrose tecidual,

servindo como barreira protetora contra patógenos e são mais fáceis de serem removidos, causando menos dor ao paciente (FRANCO e GONÇALVES, 2008; GHOMI *et al.*, 2019).

Os hidrogéis são polímeros porosos solúveis em água que apresentam uma estrutura de redes reticuladas com disposição tridimensional de suas cadeias poliméricas, possuem capacidade de reter grandes quantidades de água ou biofluidos, pois possuem forças hidrofílicas, osmóticas e de hidratação, que são contrabalanceadas, resultando em inchaço das redes de cadeias. Eles representam biomateriais com sistemas avançados de liberação de ativos, aptos a proporcionar vantagens frente às formas farmacêuticas convencionais, por serem biocompatíveis e apresentarem propriedades mecânicas adequadas (GEEVER *et al.*, 2008; EFE *et al.*, 2013; PANDE, 2017; KAMOUN *et al.*, 2017; VARAPRASAD *et al.*, 2017).

A combinação de hidrogel com a técnica da eletrofiação para produção de curativos vem sendo bastante utilizada para produção de curativos com características ideais para o tratamento das feridas (EFE *et al.*, 2013; KAMOUN *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2021).

A Eletrofiação é uma técnica promissora de produção de nanofibras usadas como curativos que utiliza alto potencial para produzir fibras poliméricas em nanoescala. Estas fibras apresentam diâmetros controlados com microestruturas porosas que se interligam entre si e apresentam uma alta versatilidade permitindo o uso de vários tipos de polímeros (GAO *et al.*, 2021).

No processo de eletrofiação as forças eletrostáticas são usadas e uma fonte de energia de alta tensão é conectada gerando um campo elétrico entre a ponta do capilar e um coletor aterrado, a gota é mantida na ponta do capilar devido à tensão superficial. À medida que a tensão aumenta, as forças viscoelásticas são superadas por forças elétricas devido ao fato de que a gota fica distorcida. Finalmente, acima de uma tensão crítica, um jato é ejetado do ápice de uma superfície cônica, conhecida como cone “Taylor” (SENER *et al.*, 2011).

Em meio às terapias alternativas, os produtos naturais vêm sendo amplamente utilizados, por suas propriedades terapêuticas, disponibilidade e o baixo custo. A própolis proveniente das abelhas da espécie *Apis mellifera* tem sido muito aplicada para tratamento de lesões cutâneas (BARBOSA *et al.*, 2009).

A própolis é conhecida como uma substância resinosa complexa que é coletada pelas abelhas para proteger as colmeias de invasores e microorganismos. Também é usado pelas abelhas para isolamento térmico e fortalecimento das colmeias, preenchendo as rachaduras e buracos. Sua composição química depende principalmente da variabilidade de origem botânica e seus constituintes e inclui polifenóis, terpenóides, esteróides e aminoácidos (EBADI e FAZELIB, 2021).

A própolis apresenta uma mistura complexa, suas atividades biológicas são relatadas devido à presença dos flavonóides, ácidos fenólicos e éteres obtidos principalmente de substâncias derivadas de plantas. Assim, embora a própolis seja um produto de origem animal, uma parte considerável de seus componentes responsáveis pelas atividades biológicas são derivados de plantas. Em virtude de seus inúmeros componentes a própolis apresenta diversas propriedades, como: antissépticas, antifúngicas, antibacterianas, antivirais, anti-inflamatórias e antioxidantes (GALEOTTI *et al.*, 2018).

Objetivou-se com este estudo produzir um curativo de hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis e avaliar sua influência na cicatrização cutânea em *Cavia porcellus*, bem como, analisar suas características físico-químicas.

REFERÊNCIAS

ANDREU, V.; MENDOZA, G.; ARRUEBO, M. et al. Smart dressings based on nanostructured fibers containing natural origin antimicrobial, anti-inflammatory, and regenerative compounds. **Material**, v.8, p. 5154-5193,2015.

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul.Enferm.**, v.22, n. 3,p. 318-322, 2009.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue Enginnering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p.1018-1029, 2007.

EFE, H.; BICEN, M.; KAHRAMAN, M. V.; KAYAMAN-APOHAN, N. Synthesis of 4-Acryloylmorpholine-based Hydrogels and Investigation of their Drug Release Behaviors. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 5, p. 814-820, 2013.

EBADI, P.; FAZELI, M. Evaluation of the potential in vitro effects of própolis and wound healing in human dermal fibroblast cells. **South Africam Journal of Botany**, 2021.

GEEVER, L.M.; COONEY, C.C.; LYONS, J.G.; KENNEDY, J.E. et al. Characterization and controlled drug release from novel drug-loaded hydrogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p.1147-1159, 2008.

FRANCO, D e GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: A escolha do curativo adequado. **Rer. Col. Bras. Cir**, v. 35, n. 3, 2008.

GALEOTTI, F.; MACCARI, F.; FACHINI, A.; *et al.* Chemical composition and antioxidante activity of própolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. **Foods**, 2018.

GAO, C.; ZHANG, L.; WANG, J.; *et al.* Wound healing process. **J. Mater. Chem. B**, v. 9, p. 3106–3130, 2021.

GHOMI, E. R; KHALILI, S.; KHORASANI, S. N. et al. Wound dressings: Currente advances and future directions. **J. Appl. Polym. Sci**, 2019.

MOHAMAD, N.; AMIN, M.C.I.M.; PANDEY, M. et al. Bacterial celulose/acrylic acid hydrogel synthesized via eletron beam irradiation: Accelerated burn wound healing in na animal model. **Carbohydrate polymers**, p. 312-320,2014.

PANDE, P. P. Polymer Hydrogels and Their applications. **Int. J. Mater. Sci**, v.12, n.1, 2017.

PERCIVAL, N. J. Classification of Wounds and their management. **The medicine publishing**, 2002.

SEAVEY, J. G.; MASTERS, Z. A.; BALAZS, G. C.; TINTLE, S. M. et al. Use of a bioartificial dermal regeneration template for skin restoration in combat casualty injuries, **Regenerative Medicine**, v.11, n.1, p.81–90, 2016.

SENER, A.G., ALTAY, A.S., ALTAY, F. Effect of voltage on morphology of electrospun nanofibers. **Conference electrical and electronics engineering**, 2011.

VARAPRASAD, K.; RAGHAVENDRA, G. M.; JAYARAMUDU, T.; YALLAPU, M. M. et al. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. **Materials Science and Engineering**, v. 79, p. 958-971, 2017.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, EL-REFAIE. S.; CHEN, X. A review on polymeric kyorgel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced-research**, v.8, 2017.

TAVAKOLI, S.; KLAR, A.S. Advanced Hydrogels as wound dressings. **Biomolecules**, 2020.

2. CAPITULO I: Produção e análise de citotoxicidade in vitro do hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis para produção de curativos

Trabalho a ser submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMG – Belo Horizonte

Produção e análise de citotoxicidade *in vitro* do hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis para produção de curativos

Production and *in vitro* cytotoxicity analysis of hydrogel based on polyvinyl alcohol (PVA) associated with propolis for the production of dressings

A.P. Alves^{1*}, M.J.C. Sá², G. G. de Lima³, B. S. Chee³, K. C. Batista⁴, E.M. de M, Filho⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária/UFMG - Patos, Paraíba.

²Professor Doutor da UAMV/UFMG – Patos, Paraíba.

³Instituto de Pesquisa de Materiais, Instituto de Tecnologia de Athlone, Irlanda.

⁴UNIFIP- Centro Universitário - Patos, Paraíba.

⁵ Universidade Federal de Campina Grande- Patos, Paraíba

*Autora para correspondência. E-mail: lane.p@hotmail.com.

RESUMO

Objetivou-se com este estudo produzir e analisar a citotoxicidade *in vitro* de hidrogel a base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis para aplicação na área de curativos biomédicos, conforme classificação e normas da ISO 10993. As amostras de própolis marrom foram coletadas de abelhas *Apis mellifera*, foram preparadas quatro amostras de própolis, onde cada uma foi composta por 1 g de própolis e 10 ml de etanol a 70%. Após a dissolução da própolis em etanol quatro hidrogéis foram fabricados por meio da técnica de eletrospinning, congelamento e descongelamento. Os hidrogéis foram produzidos nas seguintes concentrações: 5% PVA: própolis (7: 3), 5% PVA: própolis (8: 2) e 5% PVA: própolis (9: 1). Posteriormente à produção, os hidrogéis foram submetidos à análise de citotoxicidade *in vitro* pelo teste de MTT para avaliação da sua viabilidade celular. Os hidrogéis de PVA/própolis nas concentrações produzidas e avaliadas não foram citotóxicas, estando aptas a serem avaliadas em estudos *in vivo*.

Palavras-chaves: curativo biomédico, cicatrização, anti-inflamatória.

ABSTRACT

The objective of this study was to produce and analyze the *in vitro* cytotoxicity of a hydrogel based on polyvinyl alcohol (PVA) associated with propolis for application in the area of biomedical dressings, according to the classification and standards of ISO 10993. The samples of brown propolis were collected from *Apis mellifera* bees, four samples of propolis were prepared, where each one was composed of 1 g of propolis and 10 ml of 70% ethanol. After dissolving the propolis in ethanol, four hydrogels were manufactured using the electrospinning, freezing and thawing technique. The hydrogels were produced at the following concentrations: 5% PVA: propolis (7: 3), 5% PVA: propolis (8: 2) and 5% PVA: propolis (9: 1). After production, the hydrogels were subjected to analysis of *in vitro* cytotoxicity by the MTT test to evaluate its cell viability. The PVA/propolis hydrogels in the concentrations produced and evaluated were not cytotoxic, being able to be evaluated in *in vivo* studies.

Keywords: biomedical dressing, healing, anti-inflammatory.

1. INTRODUÇÃO

A ferida é uma descontinuidade no tecido que ocorre devido a uma laceração exógena na pele causando trauma, seu manejo é um desafio terapêutico não atendido e um fardo global de saúde. As atuais estratégias de tratamento apresentam eficiência limitada no manejo de feridas, passando assim por constante evolução nas abordagens de tratamento (Chen *et al.*, 2017)

O desenvolvimento de novos dispositivos que possam ser utilizados como curativos para o tratamento de feridas cutâneas tem se tornado um campo de vasta exploração científica. Para conferir tratamento adequado aos diferentes tipos de lesões, os materiais utilizados devem oferecer condições para a manutenção de ambiente adequado no leito de cicatrização (Murray *et al.*, 2019).

Os hidrogéis eletrofiados representam uma nova classe de materiais que mostram grande potencial em muitas aplicações biomédicas, pois fornecem as propriedades desejadas para curativos como absorção de exsudato, permeabilidade ao oxigênio e alta área de superfície, que é em grande parte atribuída à evolução da nanotecnologia (Chen *et al.*, 2017; Ambekar e Kandasubramanian, 2019).

A eletrofiação forma fibras através da aplicação de um campo eletrostático a uma solução polimérica, essas fibras apresentam peso leve, diâmetros pequenos, comprimentos longos, grande área de superfície por volume, alta porosidade e tamanho de poro minúsculo. A eletrofiação permite que fármacos sejam incorporados para agir no local da lesão (Bakar *et al.*, 2019; Ambekar e Kandasubramanian, 2019).

Os hidrogéis são bons candidatos para o tratamento de feridas, eles são polímeros porosos solúveis em água que apresentam uma estrutura tridimensional. Estes são desenvolvidos como géis coloidais, que contêm água como meio de dispersão e são capazes de responder de forma inteligente às variações do catalisador ambiental, como força iônica, pH, campo elétrico, temperatura, enzimas etc. Os hidrogéis se assemelham ao tecido vivo (em estado inchado) devido à sua natureza macia, flexível e biocompatível (Pande, 2017; Kamoun *et al.*, 2017).

Dentre os polímeros empregados na produção de hidrogéis, o álcool polivinílico (PVA) é um dos biomateriais mais estudados e utilizados na síntese de sistemas de liberação controlada de ativos, devido à capacidade de formar hidrogéis através da reticulação física ou química aliada as características de não toxicidade, mínima adesão celular e absorção de proteínas, tornando-o um polímero apropriado para fins biomédicos e farmacológicos (Alcântara *et al.*, 2010; Jiang e Liu, 2011).

Dentro do arsenal terapêutico utilizado na cicatrização de feridas, os produtos naturais vêm sendo largamente utilizados, sendo a própolis um dos mais empregados dentre os produtos de origem animal (Rocha e Reis, 2005).

A própolis é uma substância resinosa produzida por abelhas de diversas espécies, a partir do exsudato de plantas (árvores, flores e folhas), pólen e secreções salivares e enzimáticas, secretadas pelo metabolismo glandular desses insetos. Sua composição química é bastante variável e complexa. Estudos realizados em distintas espécies evidenciaram que a própolis possui diversas propriedades biológicas, como antifúngica, anti-tumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, cicatrizante, antiulcerogênica, antiparasitária, antioxidante e imunoestimulatória (Batista *et al.*, 2015).

Para que os biomateriais e substâncias sejam introduzidos na aplicação biomédica, eles devem ser submetidos à testes de citotoxicidade *in vitro* para comprovar

sua biocompatibilidade, certificando-se que o material não desencadeará reações adversas ao organismo (Rogerio *et al.*, 2003).

Para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, o biomaterial não deve ocasionar a morte das células nem afetar suas funções celulares. Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células, os testes podem detectar a ocorrência de lise das células, de inibição do crescimento celular e de outros efeitos que possam ser desencadeados nas mesmas (Daguano *et al.*, 2007).

Este estudo teve por objetivo, produzir e analisar a citotoxicidade *in vitro* de hidrogel a base (PVA) associado à própolis para produção de curativos, conforme classificação e normas da ISO 10993.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biomateriais do Athlone Institute of Technology (AIT) localizado na Irlanda .

Neste estudo utilizou-se o álcool polivinílico (PVA) (Mw: 195 kg/mol) com 98,0-98,8% hidrolisado, adquirido da Sigma-Aldrich. A própolis bruta foi coletada de colmeias de *Apis mellifera* localizadas em Quitandinha no estado do Paraná (PR), Brasil na primavera de 2013 da flora *Baccharis uncinella*.

Para a produção dos hidrogéis primeiro preparou-se as soluções de própolis e de PVA. A solução de própolis foi obtida através da moagem usando um moedor de legumes, depois adicionou-se 25 g de própolis a 250 ml de etanol e utilizou-se banho de ultrassom para auxiliar a extração da própolis em etanol. Todo o processo de extração durou 1 hora em temperatura de -70 °C. E então a solução foi armazenada em geladeira por mais de 24 horas e em seguida filtrada.

Posteriormente, preparou-se a solução de álcool polivinílico (PVA) a 5% a partir de 0,5 g de PVA, 10 ml de etanol a 70% aquecido a 150 °C por 3 horas. Foi preparada uma mistura de 5% de PVA e própolis em diferentes concentrações, conforme mostrado na Tab. 1.

Tabela 1: Concentrações e volumes das soluções de própolis e PVA obtidas para confecção do hidrogel a ser submetido a análise de citotoxicidade *in vitro* para produção de curativos

Amostra	Total volume (ml)	5% PVA (ml)	Propolis (ml)
5% PVA	10	10	0
5% PVA: Propolis (7:3)	10	7	3
5% PVA: Propolis (8:2)	10	8	2
5% PVA: Propolis (9:1)	10	9	1

A técnica de eletrofiação foi usada para produção dos hidrogéis de PVA/própolis, o aparelho de eletrofiação fabricado pela Spraybase, é composto por uma seringa (anexada ao emissor), um coletor aterrado e fonte de alimentação com alta tensão. Os seguintes parâmetros foram analisados no processo de eletrofiação: a concentração de PVA e própolis, condutividade, voltagem, distância entre a agulha e a placa e o tempo de execução.

Os hidrogéis de PVA com própolis (Fig. 1) foram preparados dissolvendo as amostras de PVA e própolis em um volume total de água deionizada com etanol a 70 ° C sob constante agitação até a completa solubilização do PVA.



Figura 1: Hidrogel de PVA/própolis após eletrofição.

As soluções de PVA com própolis foram eletrofiadas, aplicando tensão e pressão que variaram de acordo com a viscosidade da amostra para obter um cone de Taylor. Os hidrogéis foram eletrofiados sobre uma placa coletora de aço inoxidável onde esta foi limpa e recebeu uma gota de Tween 80 a fim de evitar a aderência dos hidrogéis à placa.

Por fim, alguns dos hidrogéis que foram eletrofiados passaram pelo processo de congelamento e descongelamento, eles foram congelados em nitrogênio líquido a uma temperatura constante de -80 ° C por 20 min, depois descongelados em temperatura ambiente e distribuídos em uma placa de 12 poços e secos em temperatura ambiente, após a produção, os hidrogéis foram submetidos ao teste de citotoxicidade *in vitro*.

A linhagem celular utilizada foi a de fibroblastos de camundongos NIH/3T3 obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-1658, Manassas, Virginia, U.S.A). Os fibroblastos NIH/3T3 foram cultivados em garrafas de 25 cm² contendo 440 ml de meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.), 5 ml de estreptomicina/penicilina (Gibco) a 1% e suplementado com 50 ml de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) a 10% em uma estufa (Sanyo) a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, trocando-se o meio a cada dois dias.

As células foram cultivadas em triplicatas na densidade de 0,5x10⁵ células por poço, contadas com o auxílio da câmara de Neubauer, em placas de cultura de 96 poços.

Removeu-se o meio original, adicionou-se 5 ml de (SFB) ao recipiente, 1 ml de solução de Tripsina-EDTA ao frasco, posteriormente, colocou-se a solução na incubadora durante 3-4 minutos, onde obteve-se 6 ml de suspensão celular que foi adicionada a um tubo que foi centrifugado a 1000 rpm, por 5 minutos, depois a suspensão foi completamente removida por micropipeta, 2 ml de meio fresco foram adicionados ao tubo centrífugo e homogeneizados.

Para a realização da contagem celular, transferiu-se para um tubo universal 0,2 ml de suspensão celular, 0,3 ml de (SFB) e 0,5 ml de reagente azul de tripano a 0,4% (corante de viabilidade). O tubo foi deixado em repouso por aproximadamente 1 minuto e 10 µl dessa suspensão celular foram adicionados a cada câmara.

O cultivo de fibroblastos NIH/3T3 foram expostos à diferentes soluções de PVA/própolis. As soluções foram compostas por 10 mg de PVA puro 5%, PVA 5%:

própolis (7: 3), PVA 5%: própolis (8: 2) e 5% PVA: própolis (9: 1), os hidrogéis foram pesados e essas amostras foram dissolvidas em 5 ml de meio DMEM e submetidos à incubação por 12 horas.

As soluções que continham quatro nanofibras foram diluídas em cinco concentrações diferentes (100%, 80%, 60%, 40%, 20%). Cada tubo Eppendorf foi preenchido com 500 µl de solução, onde 400 µl foi composta pela solução teste/DMEM e 100 µl da solução padrão/DMEM. Por exemplo, na preparação de 500 µl de controle 80% puro (PVA) foi adicionado 400 µl de solução de PVA 5% pura e 100 µl de meio fresco no tubo Eppendorf.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, onde um total de 300 µl da solução foi adicionado a cada poço, que incluía 100 µl de células, 100 µl de solução de própolis e 100 µl da solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) na concentração de 10mg/ml. Pelo fato do reagente MTT se decompor facilmente sob a luz, o que provavelmente tem maior impacto nos resultados finais da determinação, esse processo foi realizado em ambiente escuro. As células foram incubadas por 4 horas em estufa (Sanyo) a 37° contendo 5% de CO₂. Transcorridas às 4 horas, o meio com MTT foi aspirado e logo em seguida adicionado 100 µL de DMSO (Sigma) para solubilizar os sais de formazan. Por fim, o leitor de placas BioTek Synergy HT foi usado para ler a absorvância de cada poço com comprimento de onda de 540 nm e 670 nm (Fig. 2).

Diferentes concentrações de hidrogéis foram colocadas em copos separados (5% PVA, PVA: Própolis (7: 3), PVA: Própolis (8: 2), PVA: Própolis (9: 1), as amostras foram colocadas em um forno a 70 °C e depois retiradas após a secagem para evitar a influência de bactérias externas, 1 ml de meio DEME e 1 ml de suspensão de células 1×10^5 foram adicionados às 5 amostras separadamente e as 5 amostras foram incubadas durante a noite.

Devido à presença e ausência de tingimento no experimento, diferentes microscópios foram utilizados para observar as células. Os grupos 1 e 2 (sem células tingidas) foram observados por microscopia óptica, enquanto o terceiro grupo com células tingidas foram observados por microscopia de fluorescência.

Para análise através da microscopia de fluorescência, as células foram submetidas à coloração DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol), foi preparada uma solução de 1 µg / ml de DAPI em 1 ml de (SFB), três gotas de DAPI foram adicionadas no ambiente escuro e depois de esperar por aproximadamente 15 minutos, e então o (SFB) foi usado para lavar a amostra. Em seguida, foi adicionado 1 ml de metanol e fixado durante cerca de 10 minutos, depois removeu-se o metanol. As tiras de vidro esterilizadas foram retiradas e adicionadas a uma pequena gota de meio de montagem. A lâmina de vidro foi usada para cobrir a amostra e então tratada com meios de montagem. A amostra foi então seca e selada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do teste de MTT foi possível verificar que a própolis nas diferentes concentrações presentes nos hidrogéis analisados não se mostrou citotóxica, apresentando uma viabilidade celular acima de 70%, visto que, segundo a ISO (10993-5), um material é considerado não tóxico quando pelo menos 70% das células

sobrevivem. De maneira geral, pode-se observar no gráfico 1 que com o aumento das concentrações de própolis, a viabilidade celular também aumentou.

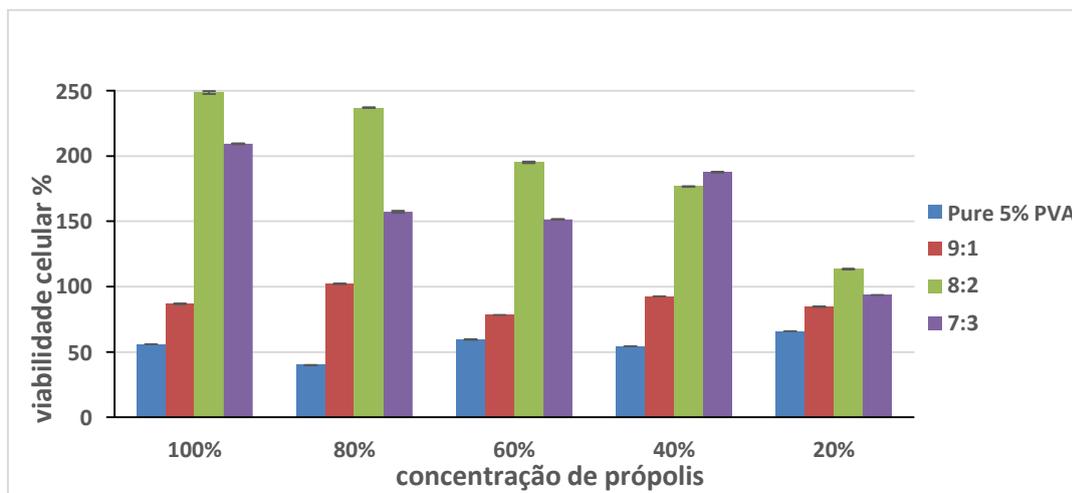


Gráfico 1: Viabilidade celular das soluções de PVA/própolis, submetidas à variáveis concentrações de própolis pelo teste de MTT, para produção de curativos de hidrogel.

Resultados semelhantes foram encontrados por Asgharpour *et al* (2019), quando mensuraram a quantificação da querentina (Q) no extrato etanólico de ardabil da própolis (AEEP) comparando seus efeitos antibacterianos, antibiofilmes e citotóxicos sobre o câncer e linhagens de fibroblastos, estes autores concluíram que o impacto sinérgico dos principais componentes da AEEP estava relacionada a inibição da proliferação de células cancerígenas e efeito citotóxico sobre estas, além de não observarem efeitos citotóxicos sobre os fibroblastos.

No entanto, Oliveira *et al* (2015), produziram hidrogéis de PVA carregados com própolis brasileira para tratamento de queimaduras em humanos, eles avaliaram as propriedades antibacterianas e citotóxicas, e constataram que os hidrogéis de PVA com própolis nas concentrações de 15% ou mais de própolis foram ativos contra bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, porém esta concentração de própolis se mostrou citotóxica para os queratinócitos.

Sobocanec *et al* (2006), apontaram que os componentes da própolis podem apresentar propriedades não antioxidantes, mas pró-oxidantes, dependendo das condições experimentais e, em altas concentrações, a própolis exerce efeitos mais adversos do que benéficos nas células. Os dados obtidos confirmaram que é fundamental aplicar a quantidade adequada de própolis para revelar a influência protetora dos polifenóis da própolis nas células sem induzir o estresse celular

Ebadi e Fazelib (2021) ao avaliarem os potenciais efeitos *in vitro* da própolis e do mel na cicatrização de feridas em células de fibroblastos dérmicos humanos, constataram que as concentrações de 100 e 200mg de extrato de própolis são as ideais para aumento da viabilidade e proliferação celular.

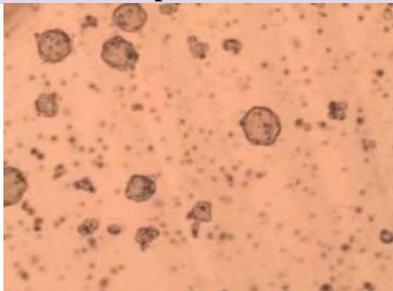
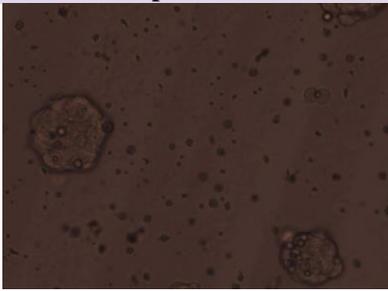
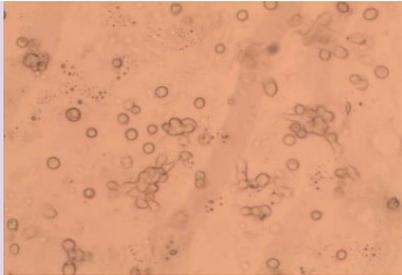
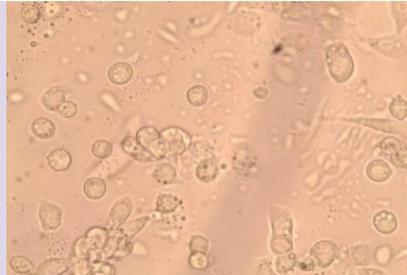
Considerando que 5% de PVA: nanofibras de própolis (7:3), 5% de PVA: nanofibras de própolis (8:2) e 5% de PVA: nanofibras de própolis (9:1) foram usados no ensaio MTT, 5% de PVA: própolis (7:3) as nanofibras têm a maior concentração de própolis. A vazão do processo de eletrofiação foi de aproximadamente 0,5 ml/h

(Doustgani, 2015) e cada nanofibra leva 30 minutos para fabricar uma amostra. 10 mg de nanofibras normais foram utilizados para dissolver em 5 ml de meio fresco para preparar soluções de drogas que foram adicionadas em cada poço. E então, 100 µl de células, 100 µl de droga, 100 µl de reagentes MTT foram adicionados em cada poço. Portanto, a concentração de própolis em cada poço pode ser calculada aproximadamente, a concentração de própolis em 100% de poços 7:3 foi de cerca de 0,278 g/l, sendo superior as concentrações consideradas ideais no estudo de Ebadi e Fazelib (2021).

Tomazzoli *et al* (2015) e Utispan *et al* (2017) afirmaram que espécies distintas de abelhas podem ter potencial para produzir própolis com significativo teor de atividade citotóxica *in vitro*, podendo a sua bioatividade ser dependente da região geográfica onde é produzida e a temporada durante a qual é coletada, portanto, a concentração de própolis utilizada neste estudo, pode ser tóxica ou não para as células, visto que não só a concentração é importante, mas também a espécie da abelha, região e vegetação predominante, também vão definir o poder de citotoxicidade dessa própolis.

As tab. 2, 3 e 4 mostram as células observadas em diferentes teores de 5% de PVA: própolis e os resultados experimentais refletiam as células observadas em diferentes microscópios.

Tabela 2: Resultados correspondentes da amostra 1 em diferentes soluções de concentração.

Células não coradas ao microscópio óptico		
Amostra 1 5% PVA	Amplitude 10x	Amplitude 20X
		
5% PVA-própolis (7:3)		

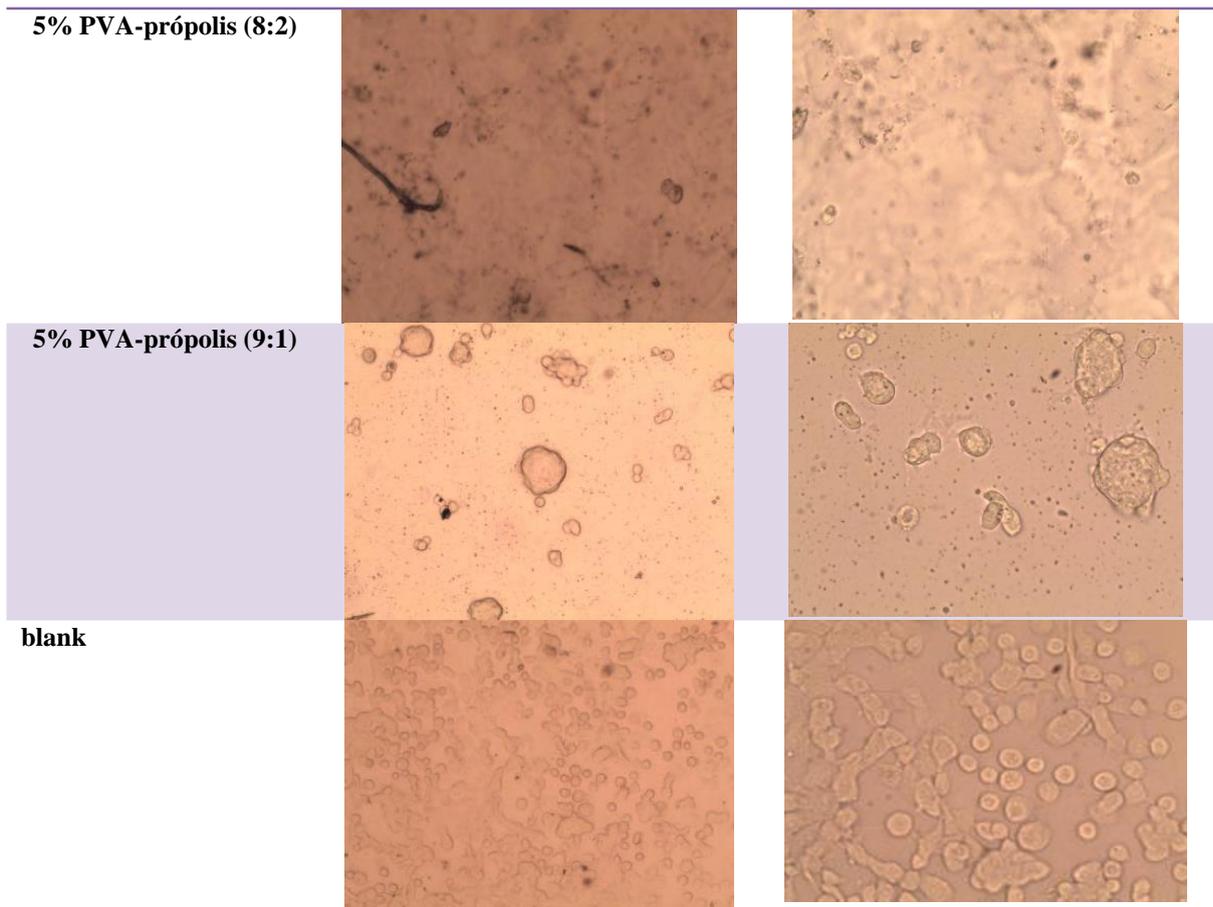
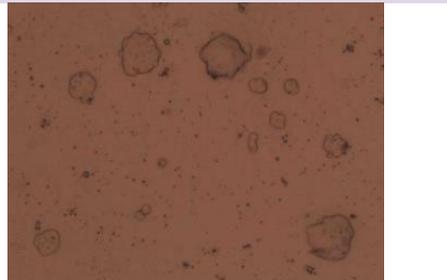
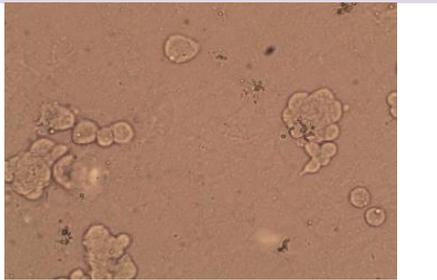
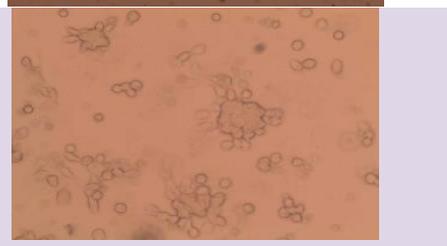
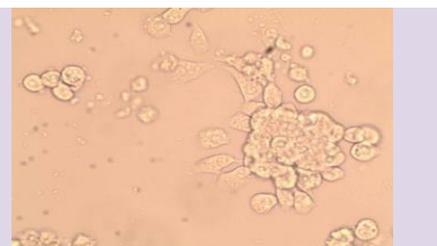


Tabela 3: resultados correspondentes da amostra 2 em diferentes soluções de concentração.

Células não coradas ao microscópio óptico		
Amostra 2	Amplitude 10X	Amplitude 20X
5% PVA		
5% PVA-própolis (7:3)		

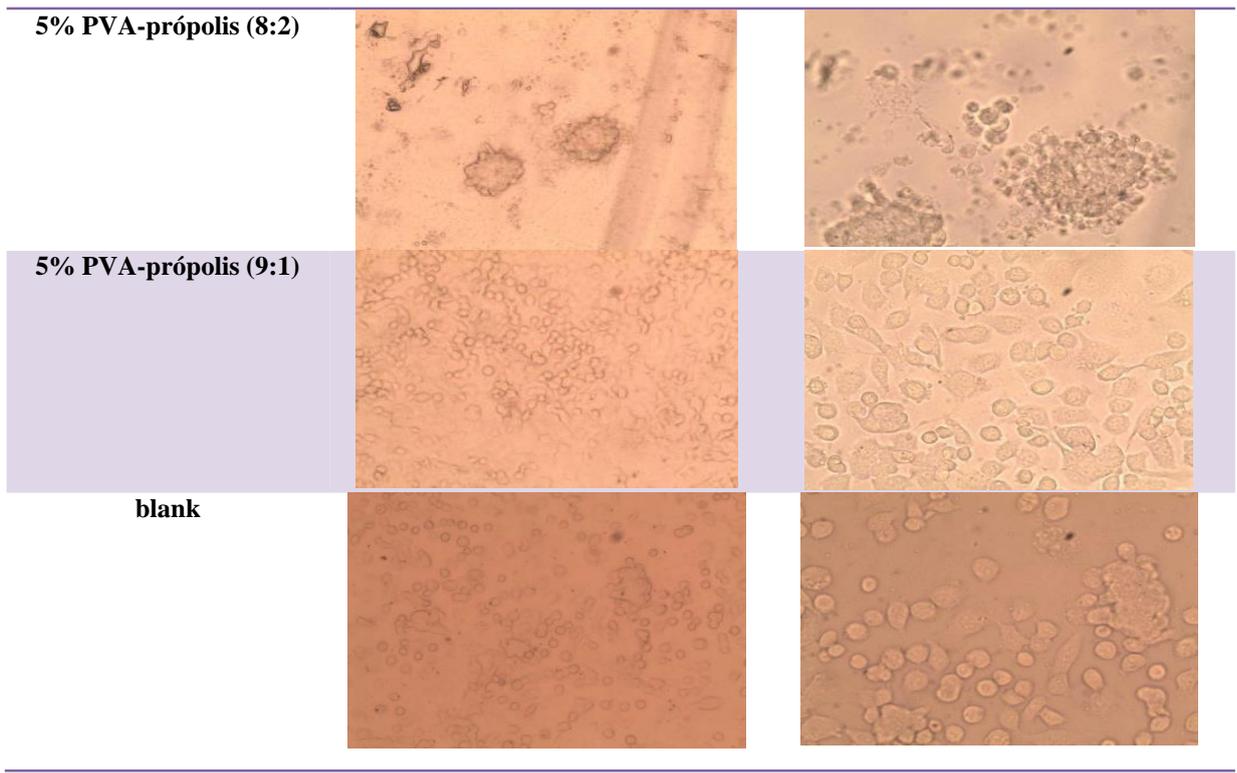
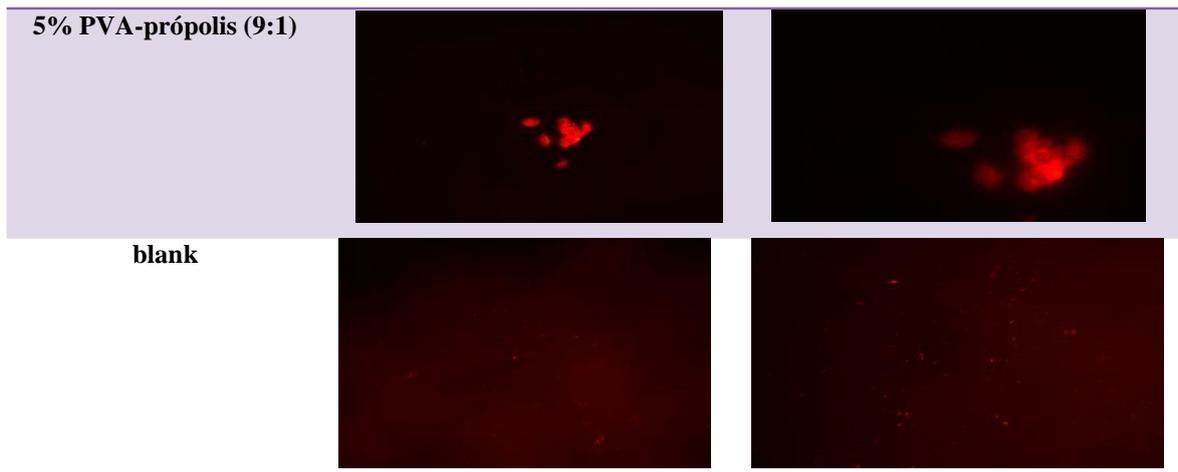


Tabela 4: resultados correspondentes da amostra 3 em diferentes soluções de concentração.

Microscopia de fluorescência em células coradas		
Amostra 3	Amplitude 10X	Amplitude 20X
5% PVA		
5% PVA-própolis (7:3)		
5% PVA-própolis (8:2)		



Nas tabelas 3 e 4 podemos observar ao microscópio óptico uma grande formação de cristais de formazan, pois a concentração de cristais formados é diretamente proporcional à concentração de células viáveis em um experimento. Em células viáveis, o reagente MTT, de coloração amarelada, é reduzido a cristais de formazan de cor púrpura, através de enzimas chamadas redutases. A atividade metabólica celular é avaliada pelo desempenho da respiração mitocondrial das células (Selimović-Dragaš et al., 2012; Galdino *et al.*, 2014).

Pelo gráf.1, nota-se uma tendência diferente entre 40% de concentração de própolis e os demais grupos. 5% PVA: dados de nanofibras de própolis (7: 3) mostraram que sua promoção do crescimento celular foi superior a outras nanofibras. Pode ter ocorrer devido à técnica de pipetagem por erro de diluição, resultando na concentração de própolis em tubo Eppendorf 7: 3 40% superior ao valor normal. Também pode ser que quando o leitor de placas foi usado para ler os resultados do MTT, as bolhas nos poços não tenham sido removidas completamente, ou existam impurezas nos poços devido à operação inadequada, levando ao aumento da absorvância.

Neste experimento, as amostras 1 e 2 não foram coradas. Células em quatro nanofibras diferentes e um grupo de controle em branco foram medidas sob um microscópio. Pode-se observar nas (tab. 3 e 4) que existem células em todas as concentrações, incluindo 5% PVA: Própolis (7: 3), 5% PVA: Própolis (8: 2) e 5% PVA: Própolis (9: 1). Isso mostra que a PVA-Própolis é adequada para o crescimento celular na concentração correspondente. Para tornar o experimento mais convincente, a amostra 3 foi adicionada ao experimento. Como mostrado na figura, há tamanhos diferentes de células na figura de 5% PVA: Própolis (7: 3), 5% PVA: Própolis (8: 2) e 5% PVA: Própolis (9: 1).

CONCLUSÃO

Os hidrogéis de álcool polivinílico com própolis de colmeias *Apis mellifera*, Brasileira, pertencentes à flora *Baccharis uncinella* não apresentaram características citotóxicas as células nas concentrações produzidas, estando aptas a serem utilizadas em testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALCÂNTARA, M. T.S.; VARCA, G.H.C.; GIANNINI, D. R. Obtenção e caracterização de Hidrogéis à base de polivinil álcool de diferentes propriedades. *19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais*, 2010.

AMBEKAR, R. S.; KANDASUBRAMANIAM, B. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *European Polymer Journal*, 2019.

ASGHARPOUR, F.; MOGHADAMNIA, A. A.; ZABIHI, E.; KAZEMI, S. Iranian própolis efficiently inhibits growth of oral streptococci and câncer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2019.

BATISTA, E.K.F.; BATISTA, M. T. F.; SOBRINHO, J.A. N.; TRINDADE, H. I. Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.17, n.3, p.413-419, 2015.

BAKAR, S. S. S.; FOONG, K. M.; HALIF, N. A. et al. Effect of solution concentration and applied voltage on electrospun polyacrylonitrile fibers. *IOP Conf. Seris: Materials Science and engineering*, 2019.

CHEN, S.; LIU, B.; CARLSON, M. A. et al. Recent advances in electrospun nanofibers for wound healing. *Nanomedicine*, 2017.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERO, S. O. Avaliação da Citotoxicidade de Biocerâmicas Desenvolvidas para uso em Sistemas de Implantes. *Matéria*, v.12, n.1, p.134-139, 2007.

DOUSTGANI, A. Effect of electrospinning process parameters of polycaprolactone and nanohydroxyapatite nanocomposite nanofibers. *Textile Research Journal*, 2015

EBADI, P.; FAZELI, M. Evaluation of the potential in vitro effects of própolis and wound healing in human dermal fibroblast cells. *South Africam Journal of Botany*, 2021.

GALDINO, A. G. S.; OLIVEIRA, E. M.; FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; ZAVAGLIA, C. A. C. Análise de ensaios in vitro do compósito de 50% TiO₂ fabricados pelo método da esponja polimérica. *Cerâmica 60*, p.586-593, 2014.

JIANG, S.; LIU, S.; FENG, W. PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, n.4, v.7, p.1228-1233, 2011.

MURRAY, R. Z.; WEST, Z. E.; COWIN, A. J.; FARRUGIA, B. L Development and use of biomaterials as wound healing therapies, *Burns e Trauma*, v.7, n.2, 2019.

OLIVEIRA, R. N.; MCGUINESS, G. B.; ROUZE, R.; QUILTY, B. et al. PVA hydrogels loaded with a Brazilian propolis for burn wound healing applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015.

PANDE, P. P. Polymer Hydrogels and Their applications. *Int. J. Mater. Sci*, v.12, n.1, 2017.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, EL-REFAIE, S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research*, 2017.

ROCHA, C.B.J.; REIS, N,S.dos. Estudo comparativo do efeito de glicosaminoglicanas ácidas sulfatada (Hirudóid®) e não-Sulfatada (ácido hialurônico) e da própolis sobre a cicatrização da pele de ratos albinos. *Revista Científica da Universidade de Franca*, vol. 5, n. 1/6, p. 101-109, 2005.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, *Material Research*, v. 6, n. 3, p.317-320, 2003.

SOBOCANEC, S.; SVERKO, V.; BALOG, T.; SARIC, A. et al. Oxidant/ Antioxidante Properties of Croatian Native. *J Agric food chem*, n. 54, p. 8018-8026, 2006.

SELIMOVIC-DRAGS, M.; HUSEINBEGOVIC, A.; KOBASLIJA, S.; HATIBOVIC-KOFMAN, Š. A comparison of the in vitro cytotoxicity of conventional and resin modified glass ionomer cements. *Bosnian journal of basic medical sciences/ Association of Basic Medical Sciences*, v.12, n.4, 273-278, 2012.

TOMAZZOLI, M. M.; NETO, R. D. P.; MORESCO, R.; WESTPHAL, L. et al. Discrimination of Brazilian própolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-Vis scanning data. *Journal of integrative bioinformatics*, v.12, 2015.

UTISPAN, K.; CHITKUL, B.; KOONTONGKAEW, S. Cytotoxic Activity of Propolis Extracts from the Stingless Bee *Trigona Sirindhornae* Against Primary and Metastatic head and Neck Cancer Cell Lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v.18, 2017.

3. CAPÍTULO II: Caracterização físico-química do hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis através dos métodos de eletrofição e congelamento/descongelamento

Trabalho a ser submetido ao manuscrito Revista Matéria-ISSN 1517-7076

Caracterização físico-química do hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis através dos métodos de eletrospinning e congelamento/descongelamento

Physicochemical characterization of polyvinyl alcohol (PVA)-based hydrogel associated with propolis through electrospinning and freezing/thawing methods

Alane Pereira Alves¹, Marcelo Jorge Cavalcante de Sá², Gabriel Goetten de Lima³, Sóstenes Arthur Reis Santos Pereira¹, Gracineide da Costa Felipe¹, Lylian Karla Gomes de Medeiros⁴

¹Aluno de pós-graduação – Universidade Federal de Campina Grande, Avenida Universitária, s/n- Santa Cecília, Patos/PB, Brasil.

e-mail: lane.p@hotmail.com

²Docente do curso de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Campina Grande-Patos/PB.

³Instituto de Pesquisa de Materiais, Instituto de Tecnologia Athlone, Athlone, Irlanda.

⁴Docente do curso de Medicina Veterinária, Unifip- Centro Universitário - Patos, Paraíba.

RESUMO

As potencialidades de nanofibras de tamanhos da ordem de 50 a 500 nm e com extensão micrométrica, têm sido investigadas para diferentes materiais, com resultados promissores em diferentes aplicações. Objetivou-se com esse estudo, avaliar as características físico-químicas dos hidrogéis de PVA/própolis pelo método de eletrospinning, e ciclos de congelamento e descongelamento. Os hidrogéis foram eletrospinnados e depois submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento, posteriormente realizou-se a caracterização físico-química, analisando a condutividade elétrica, ângulo de absorção de água, absorvância, FTIR, análise por calorimetria exploratória diferencial e microscopia eletrônica por varredura. Conclui-se que os hidrogéis de PVA/própolis eletrospinnados apresentaram de um modo geral características físico-químicas adequadas para serem usados como curativos no tratamento de lesões cutâneas, necessitando de alguns ajustes na tensão para formação de fibras mais uniformes.

Palavras-chave: tensão, temperatura de fusão, hidrofóbico

ABSTRACT

The potential of nanofibers with sizes in the order of 50 to 500 nm and with micrometric extension has been investigated for different materials, with promising results in different applications. The objective of this study was to evaluate the physicochemical characteristics of PVA/propolis hydrogels by the electrospinning method, and freezing and thawing cycles. The hydrogels were electrospun and then subjected to freezing and thawing cycles, then physical-chemical characterization was performed, analyzing electrical conductivity, water absorption angle, absorbance, FTIR, analysis by differential exploratory calorimetry and scanning electron microscopy. It is concluded that the electrospun PVA/propolis hydrogels generally showed adequate physicochemical characteristics to be used as dressings in the treatment of skin lesions, requiring some adjustments in tension to form more uniform fibers.

Keywords: stress, melting temperature, hydrophobic.

1. INTRODUÇÃO

Os hidrogéis são materiais poliméricos macios e úmidos, constituídos por uma ou mais redes tridimensionais interconectados por ligações covalentes que em condições especiais podem absorver grande quantidade de fluídos, sendo a maioria dos hidrogéis biocompatíveis e devido a essas excelentes propriedades vêm sendo amplamente utilizados nas áreas biomédicas e de engenharia [1, 2].

A combinação de hidrogel e tecnologia de eletrofiação são cada vez mais aplicadas na engenharia tecidual devido à sua boa correspondência de tecidos em composição, estrutura e sinais biológicos, podendo ser sintetizados a partir de materiais naturais ou sintéticos [1, 3].

A eletrofiação é uma técnica versátil e econômica que usa uma solução polimérica submetida a um campo elétrico de alta voltagem para produzir materiais em nanoescala (nanofibras) com uma alta tensão aplicada [4].

Curativos de hidrogéis eletrofiados agem como um obstáculo físico protegendo o tecido lesionado de contaminações externas. Eles mimetizam a estrutura da matriz extracelular e, assim, estimulam a expansão celular, melhorando a oxigenação e a expulsão de exsudatos durante a reparação tecidual [5].

Diferentes curativos à base de polímeros são utilizados para o tratamento de feridas e para o fornecimento de agentes ativos, como antibióticos, antissépticos, e substâncias anti-inflamatórias [6].

A própolis é um dos produtos naturais que podem ser utilizados como agentes ativos para ser liberado através do curativo de hidrogel diversas propriedades são atribuídas à própolis devido à sua variedade de constituintes químicos, como os ácidos fenólicos, flavonoides, quercetina etc. Sua composição química é tida como complexa, pois as substâncias nela presentes variam de acordo com sua origem geográfica e genética das abelhas responsáveis por sua coleta [7, 8].

Os parâmetros da solução, tais como, viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial influenciam diretamente nas morfologias e na geometria das nanofibras. Estes parâmetros estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos polímeros, dos solventes e com as interações do tipo polímero-solvente [9].

Diferentes técnicas de caracterização, como técnicas cromatográficas, calorimetria de varredura diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) são realizadas para uma adequada e completa caracterização físico-química de compósitos de nanofibras, para entender completamente seu potencial [10, 11].

Objetivou-se com esse estudo, avaliar as características físico-químicas dos hidrogéis de PVA/própolis pelo método de eletrofiação, e ciclos de congelamento e descongelamento.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O álcool polivinílico (PVA) (Mw: 195 kg/mol) com 98,0-98,8% hidrolisado foi adquirido da Sigma-Aldrich. A própolis bruta foi coletada de colmeias de *Apis mellifera* localizadas em Quitandinha no estado do Paraná (PR), Brasil na primavera de 2013 da flora *Baccharis uncinella*.

O extrato de própolis foi preparado pelo método de extração assistida por ultrassom de acordo com de Lima *et. al* (2016) [12]. 1 g de própolis bruta foi moída e misturada com 10 ml de etanol 70%. A mistura foi então colocada em um banho de ultrassom por 1 hora a 70 °C. Armazenou-se o extrato de própolis na geladeira durante a noite para induzir a cristalização das ceras dissolvidas. As ceras foram então removidas por filtração usando uma bomba de vácuo no dia seguinte.

A solução de PVA foi preparada para eletrofiação aquecendo 0,7 g de PVA com 7 ml de água destilada por 3 horas usando agitador eletromagnético a 70°C, posteriormente 3 ml de extrato de própolis foram adicionados à solução de PVA pré-resfriada até uma concentração final de 7% (p/v) PVA/30% (v/v) própolis, depois a solução foi então agitada a 37°C antes da eletrofiação. O aparelho de eletrofiação (Spraybase) foi usado para preparar nanofibras eletrofiadas de PVA/própolis. Os seguintes parâmetros foram adotados para o processo de eletrofiação: seringa de 3ml, concentração da própolis de 30%, agulha de 22G, distância da agulha e coletor 15cm, tensão de 22kv, taxa de alimentação de 2ml/h. A solução produzida foi submetida à análise de condutividade elétrica, teste UV-Vis e FTIR.

2.1 Condutividade

A condutividade elétrica foi obtida em uma solução a 30% de própolis bruta (m/v) a 20°C através de um condutivímetro (HANNA INSTRUMENTS EC-214), os resultados foram expressos em miliSiemens por centímetro (mS.cm⁻¹).

2.2 Análise dos espectros de absorção na região UV-Vis

A obtenção dos espectros de absorção molecular da solução de própolis foi realizada de acordo com Park e colaboradores (1998). Para esta análise utilizou-se o espectrofotômetro UV-Visível multiuso UV-1280 com faixa de medição UV de 230 nm-500 nm.

2.3 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de infravermelho das estruturas químicas das redes de PVA e própolis foram conduzidas em um espectrômetro FTIR da Perkin-Elmer, modelo Spectrum 100, utilizando refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram analisados na região de 4.000 a 500 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹.

Após as análises, o aparelho de eletrofiação (Spraybase) foi usado para preparar os hidrogéis eletrofiados de PVA/própolis. A ponta da agulha foi montada a 12 cm de distância do coletor de aço inoxidável da placa de Petri com a tensão aplicada de 10 kV e os hidrogéis foram coletados após 30 minutos do processo de eletrofiação.

Alguns hidrogéis de PVA/própolis após o processo de eletrofiação foram congelados diretamente por 1 hora usando nitrogênio líquido e descongelados em temperatura ambiente para produzir hidrogéis de PVA/própolis congelados e descongelados.

Os hidrogéis produzidos foram então armazenados em um dessecador e prontos para caracterização físico-química. As análises realizadas foram: ângulo de contato com água (WCA), calorimetria de varredura diferencial (DSC) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.4 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi conduzida em um calorímetro da (TA instruments, modelo DSC 2920), em cápsulas de alumínio fechadas com massa de amostra em torno de 4-6 mg. Sob fluxo de nitrogênio, cada amostra foi aquecida de -20° C a 260°, a taxa de aquecimento foi de 10°C / min, depois mantida a 260° C por dez minutos, depois disso cada amostra foi resfriada de -260° C a - 20° C, a taxa de resfriamento foi de 10°C/min. Por fim, cada amostra foi aquecida de -20°C a 260°C, e a taxa de aquecimento foi de 10°C/min.

Posteriormente determinou-se a cristalinidade da amostra de hidrogel da região endotérmica usando a equação abaixo, X_c:

$$X_c = \Delta H_f / \Delta H_f^0$$

Onde ΔH_f é a entalpia medida da amostra de hidrogel de PVA.

ΔH_f^0 é a entalpia termodinâmica ($\Delta H_f^0 = 150 \text{ J / g}$) de PVA 100% cristalino) (Siddhi, et al., 2009).

2.5 Ângulo de contato com água

Para avaliação do ângulo de contato com água 1 gota de água (volume aproximado da gota igual a 10 µL) foi cuidadosamente depositada, com auxílio de uma pipeta Pasteur, na superfície do hidrogel durante aproximadamente 26 a 40 segundos.

Para maior embasamento do resultado do teste qualitativo de inspeção visual foram realizados 16 registros fotográficos com o auxílio de uma câmera digital na posição de 22° e o software FTA foi utilizado para medir o ângulo de contato entre a superfície do filme.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o objetivo de se avaliar a espessura da camada de recobrimento na superfície das membranas, realizou-se a microscopia eletrônica de varredura (SEM). Para tal análise revestiu-se a amostra com ouro usando um sputter coater Baltec SCD 005, posteriormente esta foi analisada usando o microscópio eletrônico de varredura (TESCAN MIRA) com aumento de 1500 vezes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Condutividade

A solução de 5% de PVA/ própolis (7:3) resultou numa condutividade elétrica de $133(\mu\text{S}/\text{cm}^{-1})$. Este resultado se mostrou eficaz na produção das nanofibras, visto que altas condutividades diminuem o diâmetro das fibras, tornando-as mais uniformes [13].

Segundo Li *et al* (2004) [9] e WANG *et al* (2020) [14], durante o processo de eletrofiação a condutividade elétrica influencia diretamente na morfologia e na geometria das fibras ultrafinas. Este parâmetro está relacionado com as propriedades físico-químicas dos polímeros, dos solventes e com as interações do tipo polímero-solvente.

Com isso, pode-se inferir que exista uma relação entre voltagem e condutividade elétrica, fazendo com que tais parâmetros mantenham a interação polímero-coletor de tal maneira que ultrapasse a tensão superficial da solução gerando um cone de Taylor estável que ajude a formação de fibras contínuas com morfologia desejada [15].

3.2 Espectroscopia ultravioleta visível (UV)

O extrato etanólico de própolis na espectrofotometria na região ultravioleta-visível apresentou um valor máximo de absorbância nos comprimentos de onda que variaram de 255-265 nm, sendo o seu conteúdo principal os compostos fenólicos (gráfico-1).

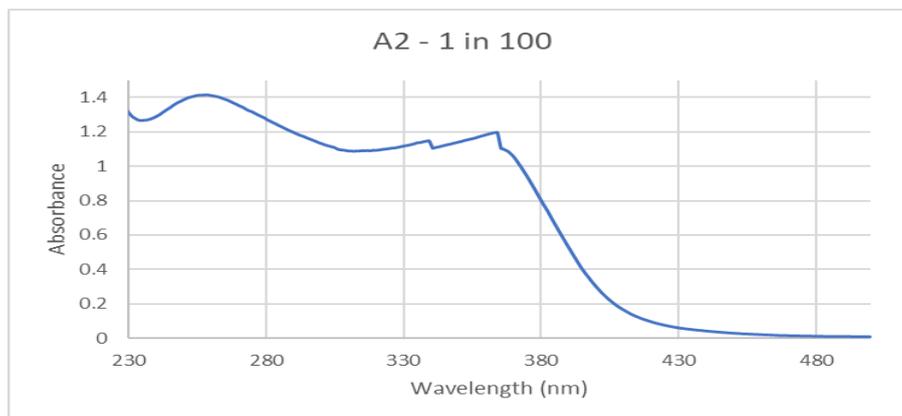


Gráfico 1- A relação de Absorbância e Comprimento de Onda da solução do extrato de própolis.

A análise por espectrofotometria na região ultravioleta-visível forneceu apenas uma característica geral dos compostos fenólicos presentes na própolis, sem quantificar cada um, deles. A espectrofotometria UV-Vis tem sido uma técnica analítica utilizada para garantir o controle de qualidade

de matrizes quimicamente complexas como os extratos de própolis, sendo largamente empregada para o doseamento de flavonoides em materiais vegetais [16].

Os resultados obtidos diferem dos encontrados por Park *et al* (1998) [17], que analisaram os espectros de absorvância dos extratos etanólicos e aquoso de própolis da espécie *Apis mellifera* dos estados de Minas Gerais, Brasil, e observaram que as amostras exibiram um perfil similar, com máxima absorção a 290nm, entretanto, o grau de absorção foi variável dependendo da concentração de etanol utilizado para extração.

3.3 Espectroscopia infravermelho de transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma ferramenta rápida para determinar o grupo funcional em uma amostra. Este instrumento produz espectro que ocorre entre 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} por vibração molecular que são alongamentos e dobras [18].

A tabela 1 mostra o resumo das faixas de pico e os grupos funcionais identificados no FTIR da solução analisada.

Tabela 1: resumo das atribuições do FTIR

FAIXAS DE PICO	GRUPOS FUNCIONAIS
3200-3600 cm^{-1}	grupo OH (hidroxila)
2976-2899 cm^{-1}	Etanol
2359-2133 cm^{-1}	Não identificado
1922 cm^{-1}	Não identificado
1651 cm^{-1}	Deformação do anel aromático, vibração de estiramento de grupos C=C, flavanóides e aminoácidos
1454 cm^{-1}	CH ₃ , CH ₂ , flavonoides, anéis aromáticos, vibração de flexão (γ) de C-H e a vibração de alongamento de aromáticos
1383-1324 cm^{-1}	Não identificado
1274 cm^{-1}	vibração do grupo C-O de polióis, como hidroxiflavanóides
1088-1048 cm^{-1}	álcoois secundários e/ou ao grupo éster de estiramento de CO
880 cm^{-1}	Etanol ou vibração do anel aromático

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados por Oliveira *et al* (2016) [19] que ao analisarem o FTIR e a quantificação de fenóis e flavanóides da própolis brasileira e britânica, sangue de dragão (*Croton lechleri*) romã (*punica granatum*) e sálvia (*salvia officinalis*), obtiveram bandas aproximadas das verificadas no presente estudo, e concluíram através de análise de FTIR que a própolis do Reino Unido era mais rica em flavanóides entre todos os compostos analisados.

Picos de ondas semelhantes foram vistos por Md Zin *et al* (2018) [18] ao estudarem a aplicação de impressão digitais FTIR acopladas a quimiométricas para comparação de própolis de abelhas sem ferrão de diferentes métodos de extração. Eles observaram que os padrões de picos de FTIR foram semelhantes entre si, porém em diferentes intensidades, onde o FTIR da própolis de abelha sem ferrão por diferentes métodos de extração apresentaram composição química complexa.

3.4 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC) mostrou que a solução de 5% de PVA/própolis (7:3), apresentou uma temperatura de transição vítrea (T_g) de 85,5°C, temperatura de fusão (T_m) 153,04°C, temperatura de cristalização (T_c) de 114,25°C, e grau de cristalização de 4,02%.

Santos *et al* (2020) [20] obtiveram resultados diferentes ao realizarem a análise por calorimetria exploratória diferencial de criogéis em camadas carregados com mel brasileira destinada ao tratamento de feridas, eles observaram que a adição de mel ao PVA diminuiu consideravelmente a temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), e o grau de cristalização (X_c) das amostras, indicando que o mel é uma barreira física à interação das cadeias poliméricas.

Os resultados obtidos diferiram dos encontrados por London *et al* (2012) [10], eles analisaram as propriedades dielétricas do poli (álcool vinílico) de hidrogéis preparados por congelamento e descongelamento, e observaram que o ponto de fusão variou de 216-220°C, onde a temperatura tornou-se mais baixa com o aumento do número de ciclos de congelamento e descongelamento, em torno de 4 a 6 ciclos, e que o grau de cristalinidade também aumentou à medida do número de ciclos.

Kolbuk *et al* (2012) [21] e Damaraju e Wu (2013) [22] afirmaram que fibras com ampla distribuição de diâmetros pode exibir diferentes propriedades térmicas, sendo necessária a análise térmica ao nível de fibra única para melhor compreensão do comportamento térmico das nanofibras.

3.5 Ângulo de contato com água

O ângulo de contato com água dos hidrogéis de 5% PVA:própolis: 7:3 foi de 30°, indicando o seu caráter hidrofílico.

O ângulo de contato com água, ou ângulo de molhabilidade representa o valor em graus que uma substância líquida forma com a superfície, permitindo avaliar a tensão superficial de sólidos, pois determina a interação entre ambos. Este ângulo está diretamente relacionado com a composição, estrutura e rugosidade da superfície dos filmes, que por sua vez, a rugosidade tem uma relação proporcional ao aumento da concentração do polímero na solução [23, 24]

O comportamento do ângulo de contato (θ) pode ocorrer para diferentes situações de molhabilidade de uma superfície: para ângulos entre $0^\circ \leq \theta < 90^\circ$, a superfície é dita hidrofílica e entre $90^\circ < \theta \leq 180^\circ$, a superfície é hidrofóbica [25]

Hidrogéis hidrofílicos são ideais para tratamento em queimaduras, pois permite uma elevada umidade quando em contato com a ferida, característica primordial para um curativo ideal [26].

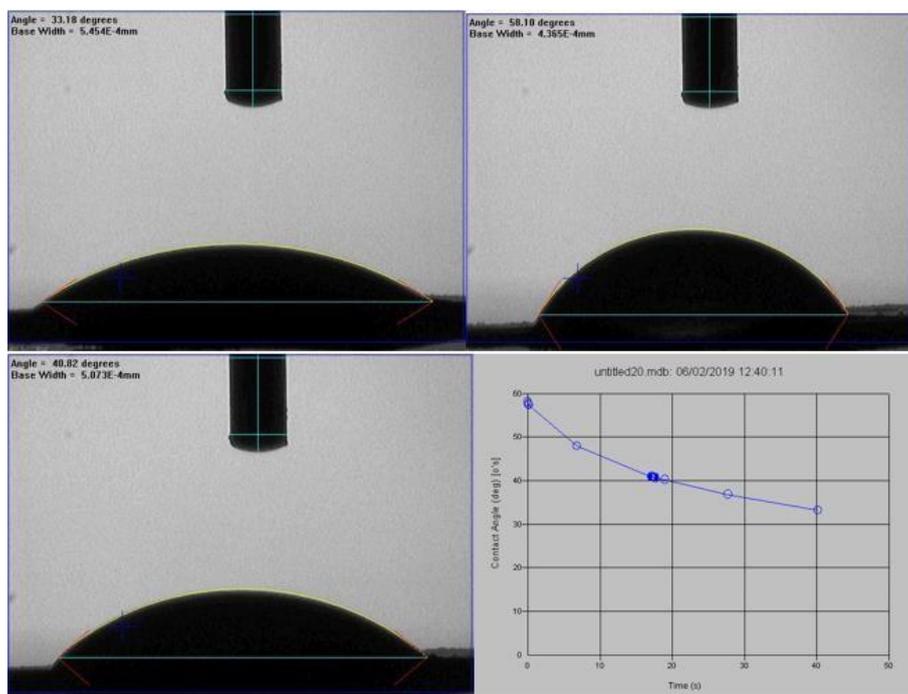


Figura 1: As primeiras 3 imagens são capturadas pela câmera em 0, 17, 40 s e a última imagem são os ângulos de contato alterados durante 40 s.

3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As nanofibras de álcool polivinílico (PVA)/própolis apresentaram partículas com diâmetros variáveis entre 200-599 nm, fibras em formato cilíndrico, levemente heterogêneas e com presença de algumas contas e junções (figura 2, gráfico 2).

Existem diversos fatores que afetam a morfologia das nanofibras, como a voltagem aplicada, a viscoelasticidade da solução, a densidade de cargas elétricas e a tensão superficial da solução. Os parâmetros ambientais, temperatura, umidade e composição do ar, também podem influenciar na formação e na morfologia das nanofibras [27].

A presença de contas e a heterogeneidade da superfície e partículas possivelmente se devem à baixa tensão aplicada (22kv) e a distância da agulha e coletor (15cm), visto que, segundo Sener *et al* (2011) [28], ao estudar o efeito da tensão na morfologia de nanofibras eletrofiadas de PVA (6%) com alginato (3%) nas tensões de 28,35,40 e 45kv observaram que a tensão aplicada de 28kv não foi suficiente para produzir nanofibras contínuas a partir das concentrações usadas e que o aumento da tensão durante a eletrofição minimizou o tamanho dos grânulos.

Heikkila *et al* (2007) [29] afirmaram que diâmetros menores de fibras foram observados com os campos elétricos mais altos, sendo este alcançado com a curta distância entre a agulha e o coletor e que a variação dos diâmetros das fibras podem está relacionados com a divisão dos jatos de eletrofição.

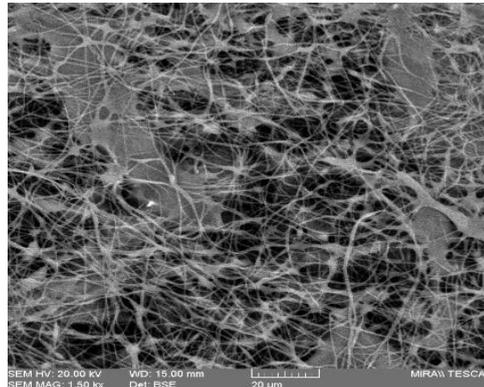


Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura do hidrogel de 5% PVA: Própolis (7:3) imagem ampliada 1500x.

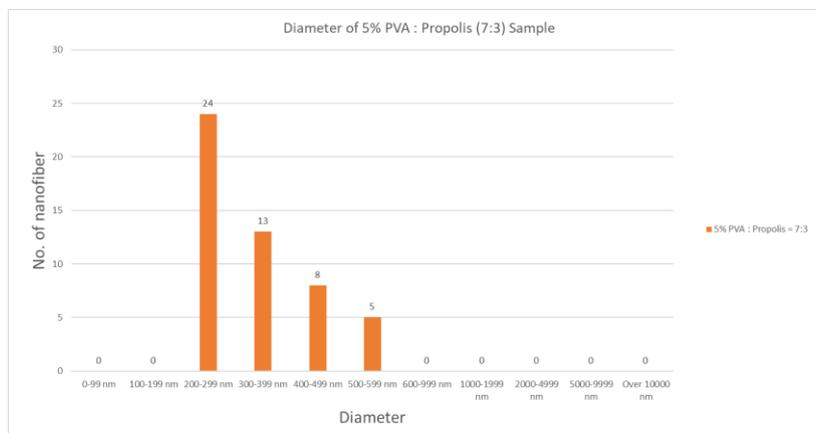


Gráfico 2: distribuição do diâmetro da nanofibra 5% PVA: própolis (7:3) nanofibra (direita).

4. CONCLUSÃO

Os hidrogéis de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis produzidos através da técnica de eletrofição e ciclos de congelamento e descongelamento, apresentaram de um modo geral características físico-químicas adequadas para serem usados como curativos no tratamento de lesões cutâneas, necessitando de alguns ajustes na tensão para formação de fibras mais uniformes.

5. REFERÊNCIAS

- [1] BORTOLIN, A., AOUADA, F. A., LONGO, E. *et al.* " Investigação do Processo de Absorção de Água de Hidrogéis de Polissacarídeo: Efeito da Carga Iônica, Presença de Sais, Concentrações de Monômero e Polissacarídeo. *Polímeros*, v. 22, n.4, p. 311-317, 2012.
- [2] ZHANG, X. N., ZHENG, Q., WU, Z. L. *et al.* "Recent advances in 3D printing of tough hydrogels: A review". *Composites part B: Engineering*, 2022.
- [3] LI, Y., WANG, J., WANG, Y. *et al.* " Advanced eletrospun hydrogel fibers for wound healing. *Composites part B: Engineering*, 2021.
- [4] EL-HADI, A.M., AL-JABRI, Y. "Influence of eletrospinning parameteres on fiber diameter and mechanical properties of poly (3- hydroxybutyrate) (PHB) and polyaniles (PANI) blends, *Polymers*, v.8, n. 97, 2016.
- [5] KENAWY, EL-R., KAMOUN, E. A., ELDIN, M. S. *et al.* " Electrospun PVA–Dextran Nanofibrous Scaffolds for Acceleration of Topical Wound Healing: Nanofiber Optimization, Characterization and In Vitro Assessment". *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2022.
- [6] SANTOS, G.S., SANTOS, N. R.R., PEREIRA, I. C. S., *et al.* " Layered cryogels laden with Brazilian honey intended for wound care", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 30, n.3, 2020, <https://doi.org/10.1590/0104-1428.06820>.
- [7] TOLEDO, L.A.S., BAVATO, M.I., ROSSETO, H.C., *et al.* " Pharmaceutical films made from the waste material from the preparation of propolis extracts: development and characterization", *Braz. J. Pharm. Sci*, v.51, n.4, 2015.
- [8] ALGARNI, M.A., NIWASABUTRA, K., SAHLAM, M., *et al.* "Propolis Exerts an Anti-Inflammatory Effect on PMA-Differentiated THP-1 Cells via Inhibition of Purine Nucleoside Phosphorylase", *metabolites*, v.9, n.4, 2019.
- [9] LI, D., WANG, Y., XIA, Y. "Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films", *Advanced materials*, v. 16, n. 4, p. 361-366, 2004.
- [10] LONDONO, M. E., JARAMILLO, J. M., SABATER, R.,*et al.* "Dielecnic properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing thawing technique, *Revista EIA.Esc.Ing. Antioq*, 2012.
- [11] ZANELLA, H.G., ROSSINA, A.R.S., HARD, C.J.*et al.* " Electrospinning PBAT (poly (butylene adipate-co-erephthalate))/PCL (poly (ε-caprolactone) blend containing propolis for the preparation of a smart wound dressing", *Química nova*, v.44,n.10, 2021.
- [12] DE LIMA, G. G., SOUZA, R. O. DE BOZZI, A. D., POPLASWSKA, M. A.,*et al* "Extraction Method Plays Critical Role in Antibacterial Activity of Propolis-loaded Hydrogels". *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.105, n.3, 1248–1257, 2016.
- [13] CHUACHAMSAI, A., LERTVIRIYASAWAT, S., DANWANICHAKUL, P. "Spinnability and Defect Formation of Chitosan/Poly Vinyl Alcohol Electrospun Nanofibers", *J. SC. Tech.*,v.13, 2008.
- [14] WANG, X-X., YU, G-F., ZHANG, J., *et al.* "Conductive polymer ultrafine fibers via eletrospinning: preparation, physical properties and applications", *Progress in Materials Science*, 2020.

- [15] MANCIPE, J. M. A., DIAS, M. L., TRIRÉ, R. M. S. M. “ Avaliação morfológica de fibras eletrofiadas de policaprolactona em função do tipo de solvente”, *Revista Matéria*, v.24, n.3, 2019.
- [16] TOMAZZOLI, M. M., NETO, R. D. P., MORESCO, R., *et al.* “Discrimination of Brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-Vis scanning data”, *Journal of integrative bioinformatics*, vol. 12, n. 4, p. 15-26, 2015.
- [17] PARK, Y. K., IKEGAKI, M., ABREV, J. S. S., *et al.* “Estudy of the preparation of the propolis extracts and yours applications”, *Food Sci. Technol*, 1998.
- [18] MD ZIN, M. B., AZEMIN, A., RODI, M. M. M., *et al.* "Application of FTIR fingerprints coupled with chemometric for compararison of stingless bee propolis from different extraction methods", *Malysian Journal of fundamental and applied sciences*, 2018.
- [19] OLIVEIRA, R. N., MANCINI, M. C., OLIVEIRA, F. C. S., *et al.* Análise FITIR e quantificação de fenóis e flavanóides de cinco extratos de plantas comercialmente disponíveis usados na cicatrização de feridas, *Revista Matéria*, 2016.
- [20] SANTOS, G. S., SANTOS, N. R. R., PEREIRA, I. C. S. *et al.* “Layered cryogels laden with Brazilian honey intended for wound care”, *Polímeros*, v.30, n.3, 2020.
- [21] KOLBUK, D; SAKIEWICZ, P.; KOWALEWSKI, T. “A. Optical birefringence and molecular orientation of electrospun polycaprolactone fibers by polarizing-interference microscopy”, *Eur. Polym. J.* 2012.
- [22] DAMARAJU, S. M., WU, S., JAFFE, M. *et al.* “Structural changes in PVDF fibers due to electrospinning and its effect on biological function”, *Biomed. Mater*, 2013.
- [23] OLIVEIRA, R. N., MANCINI, M. C., OLIVEIRA, F. C. S. *et al.* "Análise FTIR e quantificação de fenois e flavanóides de cinco extratos de plantas comercialmente disponíveis usados na cicatrização ou feridas, v. 21, n.3, 2016.
- [24] ASSIS, O. B. G., SILVA, V. L. “Caracterização e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações”, *Polímeros: Ciência e tecnologia*, v.13, n.4, 2003.
- [25] SILVA, W.A., PEREIRA, J., CARVALHO, C.W.P. F., *et al.* “Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido”. *Ciências Agrotecnologia*, v. 31, n. 1, pp. 154-163, 2007.
- [26] BAHADORAN. M.; SHAMLOO, A.; NOKOORANI, Y. D. Developmente of a polyvinyl alcohol/sodim alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGF-encapsulated wound healing. *Scientific reports*, 2020.
- [27] NAYAK, R., PADHYE, R., KYRATZIS, I. L *et al.*
- [28] COSTA, R. G.F., OLIVEIRA, J. E., PAULA, G. F *et al.* "Eletrofição de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica", v.22, n.2, 2012.
- [28] SENNER, A.G., ALTAY, A.S., ALTAY, F. “Effect of voltage on morphology of electrospun nanofibers”, *Conference electrical and electronics engineering*, 2011.
- [29] HEIKKILA, P., SODERLUND, L., UUSIMAKI, J. *et al.* "Exploitation of electric field in controlling of nanofiber spinning process", *Polymer Engineering and Science*, vol. 47, pp. 2065-2074, 2007.

4. CAPÍTULO III: Curativos de hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis e hidrocolóide na cicatrização cutânea de *Cavia porcellus*
Trabalho a ser submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMG – Belo Horizonte.

Curativos de hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis e hidrocolóide na cicatrização cutânea de *Cavia porcellus*

[Hydrogel dressings based on polyvinyl alcohol (PVA) associated with propolis and hydrocolloid in the cutaneous healing of *Cavia porcellus*]

A.P. Alves¹, M.J.C. de Sá², B.S. Chee³, G.G. de Lima³, V.A.S. Júnior⁴,
R.C. Alves¹, A.A.N. Silva⁴

¹Aluno de pós-graduação – Universidade Federal de Campina Grande- Patos/PB

²Docente do curso de Medicina Veterinária-Universidade Federal de Campina Grande- Patos/PB.

³Instituto de Pesquisa de Materiais, Instituto de Tecnologia Athlone, Athlone, Irlanda.

⁴Programa de pós-graduação em biociência animal-Universidade Federal Rural de Pernambuco.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a cicatrização cutânea em *Cavia porcellus*, utilizando curativos de hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) produzidos através da eletrofiação e pelo ciclo de congelamento e descongelamento, comparando a cicatrização entre os hidrogéis produzidos e com os curativos de hidrocolóides. No estudo foram utilizados dezoito *Cavia porcellus*, que foram distribuídos em três grupos, curativos de hidrogel eletrofiados (HE), curativos de hidrogel congelados/descongelados (HC) e curativos de hidrocolóide (H), com seis animais cada grupo. Os animais foram submetidos à anestesia dissociativa, antissepsia da região dorsal, posteriormente demarcou-se um defeito cutâneo circular de 2 cm que foi incisionado, removendo a pele até o músculo panículo carnoso. A cicatrização das feridas foi avaliada quanto aos aspectos macroscópicos e histopatológicos. Na avaliação macroscópica a presença de edema, inflamação e exsudato foi mais acentuada nas feridas dos curativos de hidrocolóide, não houve diferença estatística entre os dois tipos de hidrogéis utilizados. Na avaliação histopatológica, ambos os curativos de hidrogéis se mostraram semelhantes, contudo, as feridas nas quais foram utilizadas curativos de hidrocolóides apresentaram intensa reação inflamatória, discreta presença de anexos cutâneos e presença de células gigantes. Concluiu-se que ambos os curativos de hidrogéis eletrofiados produzidos se mostraram mais eficazes em relação aos curativos de hidrocolóides.

Palavras-chaves: flavanóides, feridas, curativos úmidas, hidrogéis

ABSTRACT

The objective was to evaluate the cutaneous healing in *Cavia porcellus*, using hydrogel dressings based on polyvinyl alcohol (PVA) produced through electrospinning and by the freeze-thaw cycle, comparing healing between the hydrogels produced and with hydrocolloid dressings. Eighteen *Cavia porcellus* were used in the study, which were

divided into three groups, electrospun hydrogel dressings (HE), frozen/thawed hydrogel dressings (HC) and hydrocolloid dressings (H), with six animals in each group. The animals were submitted to dissociative anesthesia, antiseptics of the dorsal region, later a circular skin defect of 2 cm was demarcated, which was incised, removing the skin up to the panniculus carnosus muscle. Wound healing was evaluated in terms of macroscopic and histopathological aspects. In the macroscopic evaluation, the presence of edema, inflammation and exudate was more pronounced in the wounds of hydrocolloid dressings, there was no statistical difference between the two types of hydrogels used. In the histopathological evaluation, both hydrogel dressings were similar, however, the wounds in which hydrocolloid dressings were used showed intense inflammatory reaction, discreet presence of skin appendages and presence of giant cells. It was concluded that both electrospun hydrogel dressings produced were more effective than the hydrocolloid dressings.

Keywords: flavanoids, wounds, wet dressings, hydrogels

1. INTRODUÇÃO

A perda tecidual da pele ou a não cicatrização das feridas decorre da desregulação no processo de cicatrização, tal alteração surge de condições fisiopatológicas ou traumas, originadas de ações mecânicas, térmicas e químicas que eventualmente podem resultar feridas extensas, amputações ou até mortalidade (Seavey *et al.*, 2016; Klar e Tavakoli, 2020; Akhmetova e Heinz, 2021).

Os curativos são dispositivos médicos utilizados para cobrir feridas abertas e proteger a lesão contra fatores externos, proporcionando um ambiente apropriado para o processo de cicatrização. Estes dispositivos se mostram como opções eficazes para o tratamento de feridas (Li *et al.*, 2022).

Diversos tipos de materiais biológicos foram desenvolvidos pela engenharia de tecidos e aplicados para regeneração tecidual e reparo de feridas, dentre eles os curativos poliméricos de hidrogéis eletrofiados que são fibras de tamanhos nanométricos obtidos através da eletrofiação (Li *et al.*, 2021).

Os hidrogéis são redes macromoleculares hidrofílicas, com teor de água semelhante a tecidos moles, podem ser usados em ferimentos por queimaduras, feridas cirúrgicas, lacerações na pele e úlceras por pressão, pois possuem características ideais que um curativo deve apresentar, a única desvantagem dos hidrogéis é sua baixa estabilidade mecânica no estado inchado, esta desvantagem pode ser revertida através da reticulação química ou física (Elbadawy *et al.*, 2017; Ghomi *et al.*, 2019).

A reticulação física através ligações de hidrogênio, ligações de Van der Waals ou ciclos consecutivos de congelamento-descongelamento é a ideal para hidrogéis usados em curativos, pois evita o uso de agentes químicos superando o problema de toxicidade (Kamoun *et al.*, 2017; Ghomi *et al.*, 2019).

A eletrofiação é uma técnica para fabricação de fibras a partir de polímeros fundidos ou soluções de polímeros usando forças eletrostáticas. O aparelho de eletrofiação típico geralmente é composto por uma seringa anexada a um emissor com bomba de alimentação, um coletor aterrado e fonte de alimentação com alta tensão (Lima *et al.*, 2018; Eom *et al.*, 2020).

Na técnica de eletrofiação alguns fatores da solução e do processamento são analisados, pois afetam a formação e estrutura das fibras, as variáveis consideradas na

solução, são: concentrações do polímero, volatilidade do solvente e condutividade da solução, já no processamento são observadas a taxa de fluxo, distância entre a agulha e o coletor e a voltagem aplicada (Nemati *et al.*, 2019).

Os curativos de hidrogéis eletrofiados apresentam várias propriedades benéficas, como alta porosidade e área de superfície elevada, suas características estruturais mimetizam a matriz extracelular que permitem-lhes fornecer suporte para fibroblastos e queratinócitos, que aderem às fibras, migram através do leito da ferida e ajudam na regeneração do dano tecidual, podendo também carrear compostos ativos incorporados, biomoléculas e células vivas em sua estrutura. A incorporação de compostos ativos nas fibras poliméricas permite a liberação controlada de fármacos no local da lesão (Eom *et al.*, 2020; Zamani *et al.*, 2020; Akhmetova e Heinz, 2021; Stojko *et al.*, 2020; Stojko *et al.*, 2021).

Polímeros naturais e polímeros sintéticos, ou uma mistura de ambos, podem ser utilizados na fabricação de fibras nanométricas, desde que possam ser dissolvidos em solventes apropriados para obter soluções ou fundidos sem degradação (Mercante *et al.*, 2021).

Um dos polímeros sintéticos mais utilizados para produção de curativos através da eletrofição é o PVA (álcool polivinílico), ele é biocompatível e apresenta excelentes propriedades, incluindo não toxicidade, biodegradabilidade, fácil processabilidade, boa resistência química e mecânica (Bahadoran *et al.*, 2020).

Uma substância natural que pode ser incorporada em fibras de polímeros para uso no tratamento das feridas é a própolis, ela é uma substância vegetal resinosa produzida pelas abelhas a partir das plantas e que são modificadas pelas ações das secreções salivares e enzimáticas desses insetos (Stojko *et al.*, 2021).

A composição química da própolis é bastante complexa e diversa, variando de acordo com a região geográfica, vegetação e época da colheita. As substâncias identificadas na própolis são: ácidos fenólicos, flavanoides, vitaminas, proteínas, aminoácidos e açúcares. Devido à diversidade de substâncias presentes na própolis, ela apresenta uma série de atividades benéficas na cicatrização tecidual, como ação anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antioxidante e cicatrizante (Stojko *et al.*, 2021).

Este estudo tem por objetivo avaliar a cicatrização cutânea em *Cavia porcellus*, utilizando curativos de hidrogel à base de álcool polivinílico (PVA) com própolis produzidos através da eletrofição e eletrofição mais ciclos de congelamento e descongelamento, comparando a cicatrização entre os hidrogéis pelos dois métodos de produção e com os curativos de hidrocolóides.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os hidrogéis de álcool polivinílico (PVA)/própolis foram produzidos no Laboratório de Biomateriais do Instituto de Tecnologia em Athlone localizado na Irlanda, estes hidrogéis passaram por teste de citotoxicidade *In Vitro* e caracterização físico-química, em seguida foram enviados para a Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB, Brasil, onde estes foram submetidos à esterilização através da radiação ultravioleta. Os hidrocolóides foram adquiridos em lojas de materiais hospitalares na cidade de Patos/PB.

O experimento foi realizado no biotério da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos/PB e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição, segundo protocolo de aprovação nº 34/2020.

Foram utilizados 18 porquinhos da índia (*Cavia porcellus*), adultos, machos e fêmeas, hípidos, da linhagem Inglesa, pesando em média 500g \pm 0,50 g (média \pm desvio padrão), provenientes de um criatório da cidade de Patos/PB. Os animais ficaram em gaiolas individuais de aço inoxidável no biotério da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos/PB, por um período de adaptação de sete dias, foram mantidos em ciclo claro / escuro de 12 h a cerca de 22 \pm 3°C, acesso livre à dieta padrão laboratorial, legumes, feno e água. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, curativos de hidrogéis eletrofiados (HE), curativos de hidrogéis congelados/descongelados (HC) e curativos de hidrocolóide (H), com seis animais cada grupo, cada animal recebeu uma fita de identificação no pescoço com a pesagem, numeração e grupo, as cores correspondentes foram: amarela, azul e verde, respectivamente.

Após o período de adaptação, os animais foram submetidos à anestesia com quetamina (Francotar®) 10ml na concentração de 100mg/ml na dose de 40 mg/kg e xilazina (Rompun®) 10ml na concentração de 20mg/ml na dose de 5 mg/kg, ambos na mesma seringa, por via intramuscular.

Foi realizada a tricotomia e antisepsia da região dorsal cervical com uso de solução alcóolica de clorexidina a 0,5%, posteriormente demarcou-se um defeito cutâneo circular de 2 cm, em seguida o segmento demarcado foi incisado, removendo a pele e tecido subcutâneo até o músculo panículo carnoso, em seguida foi inserido o curativo correspondente ao grupo avaliado (Fig 1).



Figura 1: Utilização do curativo em lesão cutânea em *Cavia porcellus*. 1-Curativo de hidrogel de PVA/própolis, 2-demarcação do defeito cutâneo, 3-incisão e ressecção de pele, 4-implantação do curativo.

A cicatrização das feridas foi avaliada quanto aos aspectos macroscópicos e histopatológicos.

As feridas foram avaliadas a cada três dias, durante 30 dias e documentadas por meio de fotografias digitais do dorso de cada animal. Nos dias de avaliações, os animais

foram pesados e as feridas limpas com solução fisiológica de NaCl 0,9% com gaze estéril e realizada a troca do curativo com o hidrogel ou hidrocolóide corresponde ao grupo. Em seguida o dorso de cada animal foi revestido com atadura e micropore para evitar a retirada dos curativos. Foi administrado 1mg/kg de dipirona oral a cada 12 horas, durante 3 dias, para controle da dor.

Para avaliação macroscópica utilizou-se uma ficha contendo os parâmetros de coloração da ferida, presença de edema, presença de secreção e tamanho da ferida, esta foi avaliada por meio do uso de um paquímetro digital. Os parâmetros de comparação, uma vez identificados, foram quali-quantificados segundo os critérios em que (-) corresponde à ausência de quaisquer dos eventos, (+) manifestação discreta dos mesmos, (++) sinais moderados e (+++) sinais intensos.

Decorridos trinta dias, todos os animais foram anestesiados com mesmo o protocolo anestésico inicial, acrescentando 0,5 ml de lidocaína no forame magno. Após a eutanásia os animais foram submetidos à necropsia para coleta da pele na região dorsal até a base do músculo panículo, posteriormente as amostras foram enviadas ao laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) para processamento e análise histopatológica.

As amostras foram fixadas em solução de formol a 10%, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e lavadas com xilol, por fim foram fixadas em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em micrômetro com 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina, as lâminas foram analisadas em microscopia de luz por avaliador que desconhecia sobre os tratamentos, e os seguintes critérios de avaliação foram adotados: deposição de colágeno, fibroplasia, reação inflamatória, anexos cutâneos e presença de células gigantes, para estes critérios foram atribuídos escores de acordo com a intensidade da alteração, ausência (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3).

A análise estatística foi realizada empregando o programa BioEstat 5.0 ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Utilizou-se a Análise de Variância de duas vias e o teste de Tukey ou o teste de Friedman, para a comparação entre os momentos.

O tempo da cicatrização de pele foi avaliada pela estatística descritiva, a comparação entre os grupos na avaliação macroscópica foi realizada pelo teste t de Student ou U-Mann-Whitney e os escores de avaliação histopatológica pelo grau de percentagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo médio de cicatrização do grupo (HE) se mostrou menor comparado ao grupo (HC) e (H) (Tab. 1). Porém, dos seis animais do grupo (HC), um a cicatrização ocorreu com dezenove dias, três com vinte e um dias, e dois animais a ferida não cicatrizou completamente até o dia da eutanásia, considerando-se então 30 dias como de cicatrização para fim estatístico.

Destes dois animais que houve atrasos na cicatrização, um durante a necropsia foi observado aumento de uma das glândulas adrenais, e no outro animal foi visto lesões de alopecia na região próxima a ferida.

Alterações das adrenais podem está relacionadas ao hiperadrenocorticismismo, o excesso de glicocorticoides acarretam redução na secreção de citocinas

(imunossupressão) e diminuição da expressão de genes relacionados à cicatrização de feridas (Caffarini *et al.*, 2019).

Tabela 1. Tempo de cicatrização das feridas cutâneas em porquinhos da Índia, de acordo com o curativo utilizado: hidrogel de pva/própolis por eletrofiação e congelamento/descongelamento; hidrogel de pva/própolis por eletrofiação, e curativo de hidrocolóide.

Dias	Grupo (HC) n: 6	Grupo (HE) n:6	Grupo (H) n:6
Média ± DP	24 ± 4,8	21,6 ± 1,2	25 ± 1,5

Grupo (HC): hidrogel de pva/própolis por eletrofiação e congelamento/descongelamento; Grupo (HE): hidrogel de pva/própolis por eletrofiação; Grupo (H): hidrocolóide.

De um modo geral os curativos de hidrogéis (HC e HE) se mostraram superiores no período de cicatrização, comparado ao curativo de hidrocolóide. Possivelmente, isso se deve ao fato do método de produção e composição dos hidrogéis, visto que os dois curativos foram produzidos pelo método de eletrofiação e são compostos por álcool polivinílico (PVA) que é um polímero que apresenta propriedades desejáveis no campo biomédico, e a própolis que apresenta características anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante.

Outra hipótese para cicatrização um pouco mais precoce dos curativos de hidrogéis em relação aos curativos de hidrocolóide é que este é mais espesso, diminuindo consideravelmente a concentração de oxigênio no leito da ferida, visto que estudos mostram que tecidos isquêmicos e acometidos pela hipóxia arterial apresentam um atraso no processo de cicatrização, apesar de que a baixa tensão de oxigênio é um fator primordial para angiogênese, ela precisa ser de forma controlada na superfície da ferida, sendo esse controle realizado com mais eficiência pelos curativos de hidrogéis, em virtude da eletrofiação (Soares, 2018).

Segundo, Gao *et al* (2021) e Mercante *et al* (2021) a eletrofiação produz fibras manométricas que mimetizam a matriz extracelular, pois proporcionam uma combinação adequada de suporte mecânico, orientação topográfica e bioquímica para as células conferindo um ambiente adequado e ideal para proliferação celular e consequentemente cicatrização tecidual.

Os resultados obtidos neste estudo, corroboraram com os encontrados por Alberti *et al* (2020) quando analisaram nanosscaffolds de PVA eletrofiados associados a nanopartículas de própolis como atividade cicatrizante em camundongos diabéticos, eles comprovaram que as feridas cicatrizaram mais rapidamente comparado ao grupo controle e atribuíram o resultado à ação sinérgica da composição química da própolis e do PVA.

Bahadoran *et al* (2021) ao avaliarem a cicatrização de pele em ratos com queimaduras, usando um sistema híbrido de microesfera/hidrogel, composto por álcool polivinílico (PVA)/o hidrogel de alginato de sódio incorporados à microesferas de PCL encapsulas em bFGF, observaram que o andaime fabricado contribuiu de forma eficiente para promover a regeneração tecidual induzida por células e a cicatrização de feridas por queimadura.

Não houve diferença estatística da área das feridas entre os grupos no período de D0. Nos períodos D3, D6, D9, D12, D15, D18, D21 e D24, a área das feridas se mostrou menor nos grupos (HC) e (HE) em relação ao grupo (H). Os grupos (HC) e (HE) não houve diferença estatística entre eles (Tab. 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão da área de cicatrização das feridas cutâneas nos momentos D0, D3, D6, D9, D12, D15, D18, D21 e D 24. Dos grupos (HC), (HE) e (H).

Grupos	D0 (cm)	D3 (cm)	D6 (cm)	D9 (cm)	D12 (cm)	D15 (cm)	D18 (cm)	D21 (cm)	D24 (cm)	D27 (cm)	D30 (cm)
HC	12,3 ±0,6 ^a	10,6± 0,3 ^a	7,6± 0,5 ^a	6,4± 0,3 ^a	3,7± 0,5 ^a	1,4± 0,3 ^a	0,7±0 ,3 ^a	0,3±0 ,4 ^a	0,1±0 ,02 ^a	0,1±0 ,1	0,1± 0,1
HE	12,0 ±0,4 ^a	10,7± 0,4 ^a	7,8±0 ,2 ^a	6,2±0 ,2 ^a	3,6±0 ,4 ^a	1,4± 0,1 ^a	0,7±0 ,1 ^a	0,2±0 ,1 ^a	0,1±0 ,02 ^a	0 ^a	0 ^a
H	12,3 ±0,2 ^a	11,4± 0,3 ^b	10,6± 0,2 ^b	9,3± 0,2 ^b	6,0± 0,2 ^b	2,5± 0,5 ^b	1,7± 0,2 ^b	0,6± 0,1 ^b	0,2± 0,01 ^a	0 ^a	0 ^a

a - Em cada coluna, a letra (a) indica ausência de diferença estatística entre momentos dentro de cada grupo. b - em cada linha, a letra (b) indica diferença estatística entre grupos em cada momento experimental. (HC)-hidrogel de PVA/própolis por eletrofiação/congelamento e descongelamento; (HE)-hidrogel de PVA/própolis por eletrofiação; H-grupo controle (curativo de hidrocolóide).

Nas áreas de cicatrizações do grupo que utilizou hidrocolóide houve redução gradual da ferida até a completa cicatrização, porém, ocorreu de forma mais lenta comparativamente aos grupos dos hidrogéis (HC e HE). A resposta cicatricial do hidrocolóide neste estudo, diferiu dos encontrados por Coelho *et al* (1999), quando avaliaram a contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele produzidos com poliuretano, hidrocolóide, hemocelulose, vaselina e gaze. Os autores observaram que o hidrocolóide proporcionou redução significativa da área inicial da ferida até o 7º dia, não se observando diferenças significativas entre os tratamentos nos períodos seguintes.

A hipótese para a diferença da cicatrização da pele com o uso do hidrocolóide em relação aos demais grupos esta relacionada com o tipo de ferida, pois a lesão em que utilizou-se o hidrocolóide era profunda e com um grau de exsudato que variou de moderado a intenso, entretanto, sua indicação é para feridas abertas não infectadas, com exsudação leve a moderada e úlceras de pressão superficiais de grau I e II, sendo contraindicado seu uso em feridas infectadas que apresentam tecido desvitalizado ou necrose e queimaduras de 3º grau (Santos *et al*, 2017).

Na avaliação macroscópica da inflamação não foi observada diferença estatística dos curativos utilizados entre os dias (D0 e D6), contudo, entre os dias (D9-D18) observou-se uma resposta inflamatória mais intensa no grupo do hidrocolóide (Tab.3).

Tabela 3: Média e desvio padrão dos escores de avaliação macroscópica das feridas cutâneas nos momentos D0, D3, D6, D9, D12, D15, D18. Dos grupos (HC), (HE) e (H).

Parâmetros	Grupos	D0	D3	D6	D9	D12	D15	D18
Inflamação	HC	3,0±0 ^a	2,3±0,5 ^a	1,4±0 ^a	0,8±0,4 ^a	0 ^a	0,5±0,5 ^a	0
Inflamação	HE	3,0±0 ^a	2,2±0,4 ^a	1,3±0,5 _a	0,3±0,5 ^a	0 ^a	0,1±0,4 ^a	0
Inflamação	H	3,0±0 ^a	3,0±0 ^b	3,0±0 ^b	2,5±0,5 ^b	1,8±0,4 ^b	1,1±0,4 ^b	0,1±0,4 _b
Edema	HC	2,1±0,5 _a	1,5±0,4 ^a	1,5±0,4 _a	0,5±0,5 ^a	0 ^a	0 ^a	0
Edema	HE	2,0±0,6 _a	1,3±0,5 ^a	1,3±0,5 _a	0,3±0,5 ^a	0 ^a	0 ^a	0
Edema	H	3,0±0 ^b	3,0±0 ^b	2,8±0,4 _b	2,0±0 ^b	0 ^a	0 ^a	0
Exsudato	HC	1,4±0 ^a	1,3±0,5 ^a	1,0±0,6 _a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0
Exsudato	HE	1,1±0,4 _a	1,1±0,4 ^a	1,1±0,4 _a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0
Exsudato	H	3,0±0 ^b	2,6±0,5 ^b	3,0±0 ^b	1,6±0,5 ^b	1,0±0,6 ^b	0,3±0,8 ^b	0
Presença de crostas	HC	0 ^a	0,6±0,5 ^a	1,3±0,5 _a	2,5±0,5 ^a	3,0±0 ^a	2,8±0,4 ^a	2,1±0,9 _a
Presença de crostas	HE	0 ^a	0,5±0,5 ^a	1,2±0 ^a	2,2±0,4 ^a	3,0±0 ^a	2,8±0,4 ^a	2,0±0 ^a
Presença de crostas	H	0 ^a	0 ^b	0,5±0,5 _b	1,1±0,4 ^b	1,8±0,4 ^b	1,6±0,8 ^b	1,0±0 ^b

a - Em cada coluna, a letra (a) indica ausência de diferença estatística entre momentos dentro de cada grupo. b - em cada linha, a letra (b) indica diferença estatística entre grupos em cada momento experimental. HC-hidrogel de PVA/própolis por eletrofiação/congelamento e descongelamento; HE-hidrogel de PVA/própolis por eletrofiação; H-grupo controle (curativo de hidrocolóide).

Perez, (2017), ao avaliar o reparo epitelial das feridas em calvaria de ratos, com a utilização de curativos de espuma antibacteriana, anti-inflamatória, hidrocolóide transparente e coágulo, como grupo controle, observou que a resposta inflamatória não apresentou diferenças entre as membranas no mesmo período, confirmando a não ação de corpo estranho das membranas comparado ao grupo controle.

Podemos insinuar que a resposta inflamatória mais satisfatória nos grupos dos hidrogeis de PVA/própolis por eletrofiação e congelamento/descongelamento se deve ao fato desses curativos serem incorporados com ativos de ação anti-inflamatória, como é o caso da própolis, esta apresenta componentes que possuem ação anti-inflamatória e age de forma direta na ação reguladora da resposta imune celular (Algarni *et al*, 2019) (Fig. 2,3,4).



Figura 2: Evolução da cicatrização cutânea com a utilização do curativo de PVA/própolis pelo método de eletrofiação/congelamento e descongelamento, período de D0-D24.



Figura 3: Evolução da cicatrização cutânea com a utilização do curativo de PVA/própolis pelo método de eletrofiação, período de D0-D21.



Figura 4: Evolução da cicatrização cutânea com a utilização do curativo de hidrocolóide, período D0-D24.

Na avaliação do edema, não se obteve diferença estatística no período D0 ao D3 entre os grupos, porém o edema foi significativamente mais acentuado no grupo do curativo hidrocolóide no período D6 ao D12. Não houve diferença estatística entre os grupos dos curativos de hidrogeis de PVA/própolis por eletrofação e congelamento/descongelamento.

O edema surge durante a fase inflamatória que é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular e intensa vasodilatação, essa fase ocorre imediatamente à injúria tecidual e dura até três dias, isso explica o grau semelhante do edema entre os grupos até o D3 do pós-operatório (Dogan *et al*, 2019).

O grau acentuado do edema nos períodos D6 ao D12 possivelmente se deve à persistência de liberação de citocinas pró-inflamatórias, em virtude do hidrocolóide não possuir em sua composição nenhuma propriedade que possa inibir a ação dessas citocinas.

A exsudação foi mais acentuada no grupo do curativo de hidrocolóide, não observando-se diferença estatística entre os grupos dos hidrogeis. Segundo Hess, 2002, os hidrocolóides produzem um ambiente úmido ideal no leito da ferida, controlam o exsudato, facilitam o desbridamento autolítico e fornecem uma barreira de proteção contra microorganismos externos.

Durante as trocas dos curativos foi observado odor em alguns animais que usaram os curativos de hidrocolóide, esse odor pode ter ocorrido em virtude de contaminação da ferida, visto que as trocas dos curativos não foram realizadas em ambiente asséptico, apesar dos cuidados com higienização nos momentos da mudança dos curativos. Desse modo, tais características da ferida diferem das afirmações feitas por Pereira (2005), este alegou que entre as vantagens da utilização do hidrocolóide é que ele retém odores e mantém o pH ácido no leito da ferida impedindo o crescimento bacteriano.

Quanto à presença de crostas nas feridas, não se observou diferença estatística entre os curativos de hidrogel por eletrofiação e congelamento/descongelamento. Contudo, do D3 ao D12 a presença de crostas nas feridas dos curativos de ambos hidrogéis, foi superior ao curativo de hidrocolóide.

O resultado obtido decorreu do curativo de hidrocolóide ser mais úmido do que os curativos de hidrogéis e formar um gel sobre a ferida, visto que a presença de um ambiente úmido na ferida diminui a formação de crostas (Mandelbaum *et al*, 2003).

Na avaliação histopatológica os hidrogéis de PVA/própolis pelo método de eletrofiação não apresentaram diferença estatística em relação aos hidrogéis de PVA/própolis pelo método de eletrofiação/congelamento e descongelamento. Todavia, estes diferiram significativamente em relação à resposta cicatricial dos curativos de hidrocolóide (Tab. 4).

Tabela 4: Escores de avaliação histopatológica da cicatrização das feridas cutâneas em porquinhos da índia, de acordo com o curativo utilizado: membrana de pva/própolis por congelamento e descongelamento; membrana de pva/própolis por eletrofiação, e curativo de hidrocolóide.

Grupos	Deposição de colágeno	Fibroplasia	Reação inflamatória	Anexos cutâneos	Presença de células gigantes
(HC)	93% intensa	96% moderado	98% discreta	95% moderado	100% ausente
(HE)	95% intensa	95% moderado	97% discreta	97% moderado	100% ausente
(H)	90% intensa	92% moderado	98% intensa	92% discreto	80% discreto

A fase de remodelamento estava presente em todas as feridas avaliadas nos três grupos de estudo.

Não houve diferença estatística dos parâmetros analisados entre os grupos de hidrogéis de PVA/própolis pelo método de eletrofiação e eletrofiação/congelamento e descongelamento.

O grau de deposição de colágeno e fibroplasia foi semelhante entre os três grupos. Isso se deve ao fato que os curativos de hidrocolóide e hidrogéis são coberturas que mantêm a ferida úmida, tal característica proporciona um ambiente ideal com fatores de crescimento que estimulam a fibroplasia, deposição de colágeno e epitelização (Filho *et al*, 2014).

As feridas nas quais foram utilizados curativos de hidrocolóide, apresentaram intensa reação inflamatória com discreta presença de anexos cutâneos, observou-se ainda presença intensa de plasmócitos, linfócitos e células gigantes do tipo corpo estranho, característica de reação inflamatória granulomatosa (crônica) (Fig. 2).

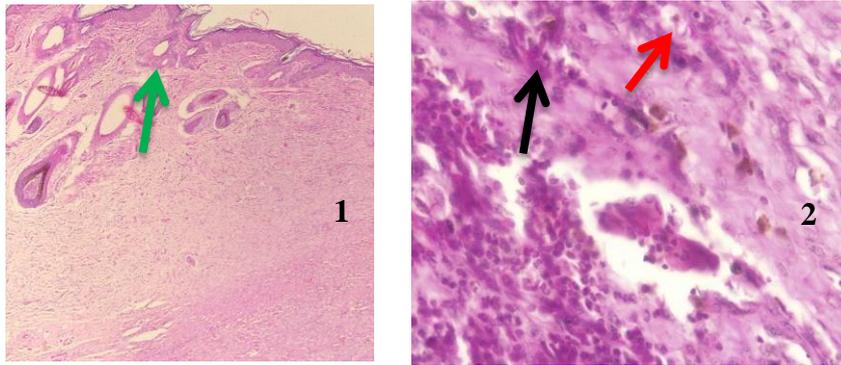


Figura 5- Avaliação histopatológica do curativo de hidrocolóide (1) seta verde- discreta presença de anexos cutâneos (2) seta preta- plasmócitos, seta vermelha-células gigantes.

A presença de plasmócitos, linfócitos e células gigantes do tipo corpo estranho ocorreu devido a uma reação histiocítica a material inerte sem uma resposta imune adaptativa, assim como ocorre em materiais de sutura e alimentar. A inflamação granulomatosa caracteriza-se pela produção de granulomas distintos compostos por agregados de histiócitos epitelióides, com um manguito periférico de linfócitos e plasmócitos, e algumas vezes, com centro necrótico. Esses granulomas apresentam duas etiologias: granulomas de células gigantes de corpo estranho e granulomas imunes (Shah *et al.*, 2017).

Nos animais que usaram curativos de hidrogéis de PVA/própolis pelo método de eletrofição e eletrofição/congelamento e descongelamento, observou-se presença de glândulas sebáceas em formação, áreas de reestruturação da pele, com intensa fibroplasia, folículos jovens, faixa extensa de tecido conjuntivo com colágeno denso e com discreta reação inflamatória (Fig. 3A e B).

A formação de anexos cutâneos foi mais significativa entre os curativos de hidrogéis de PVA/própolis pelo método de eletrofição e eletrofição/congelamento e descongelamento, em contra partida esses anexos foram discretos no grupo do curativo de hidrocolóide.

Os anexos cutâneos incluem folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A recuperação da função sensorial da pele é um importante indicador de regeneração cutânea (Weng *et al.*, 2020).

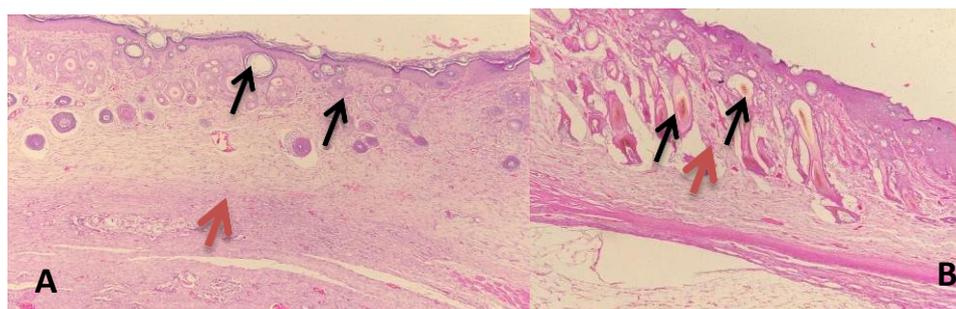


Figura 6: (A) Avaliação histopatológica do curativo de hidrogel de PVA/própolis pelo método de eletrofiação (B) curativo de hidrogel de PVA/própolis pelo método de eletrofiação/congelamento e descongelamento.

A e B (setas pretas)-glândulas sebáceas e folículos pilosos.

A e B (seta vermelha)-faixa de tecido conjuntivo denso e fibroplasia, (setas verdes)-vasos sanguíneos

O desenvolvimento mais intenso desses anexos indica um grau de amadurecimento e regeneração epidérmico mais acentuado, estes dados sugerem que constituintes químicos presentes no extrato da própolis exercem um papel fundamental na proliferação de queratinócitos, assim como a técnica de eletrofiação propicia alta porosidade e fornece um ambiente complexo que imita a estrutura morfológica da matriz extracelular, aumentando a capacidade de cicatrização das feridas além de apresentar área de superfície elevada fazendo com que aumente a taxa de dissolução da própolis (Lipovac, 2011; Mercante et al., 2021)

4. CONCLUSÕES

Não houve diferença no processo de cicatrização cutânea entre os curativos de hidrogéis de PVA/ própolis pelo método de eletrofiação e eletrofiação/congelamento e descongelamento, contudo, ambos os hidrogéis foram superiores aos curativos de hidrocolóide estimulando a cicatrização e promovendo uma reação inflamatória mais satisfatória.

5. REFERÊNCIAS

ALGARNI, A.M.; NIWASABUTRA, K. A.; NIWASABUTRA, K.; SAHLAN, M. Propolis Exerts an Anti-Inflammatory Effect on PMA- Differentiated THP-1 Cells via Inhibition of Purine Nucleoside Phosphorylase. **Metabolites**, 2019.

ALBERTI, T.B.; COELHO, D.S.; PRÁ, M. et al. Electrospun PVA nanoscaffolds associated with própolis nanoparticles with wound healing activity. **J Mater Sci**, 2020.

AKHMETOVA, A.; HEINZ, A. Electrospinning proteins for wound healing purposes: Opportunities and Challenges. **Pharmaceutics**, n.13, v.4, 2021.

- BAHADORAN, M.; SHAMLOO, A.; NOKOORANI, Y. D. Developmente of a polyvinyl alcohol/sodim alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGF-encapsulated wound healing. **Scientific reports**, 2020.
- CAFFARINI, M.; ARMENI, T.; PELLEGRINO, P. Cushing Syndrome: The role of MSCs in wound healing immunosuppression, commorbidities, and antioxidant imbalance. **Frontiers in cell and developmental Bioly**, 2019.
- EOM, S.; PARK, S.M.; HONG, H. et al. Hydrogel-Assisted eletrospinning for fabrication of a 3 D tailord nanofiber macrostructure. **Acs Appl Mater Interfaces**, v.12, p.51212-51224, 2020.
- FILHO, N.P.R.; MENDES, P.S.; SOUZA, M.S.B. et al. Uso de coberturas no tratamento de feridas de cães e gatos: Revisão de literatura. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – pequenos animais e animais de estimação**, v.12, n.40, p.1-637, 2014.
- GAO, C.; ZHANG, L.; WANG, J. et al. Eletrospun nanofibers promote wound healing: theories, techninques, and perspectives. **Journal of Materials chemistry B**, v.9,p.3106-3130, 2021.
- HESS, C.T. Tratamento de feridas e úlceras. Rio de Janeiro-RJ: Reichmann& Affonso, 2002.
- LI, T.; SUN, M.; WU, S. State-of-the-art review of eletrocpun gelatina-based nanofiber dressings for wound healing applications. **Nanomaterials**, 2022.
- LIPOVAC, M.; CHEDRAUI, P.; GRUENHUT, C.; GOCAN, A.; KURZ, C.; NEUBER, B.; IMHOF, M. Effect of red clover isoflavones over skin, appendages, and mucosal status in postmenopausal women. *Obstet Gynecol Int.* v. 2011, p. 1-6, 2011.
- MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte I. **An. Bras. Dermatol**, 2003.
- MERCANTE, L. A.; ANDRÉ, R. S.; MACEDO, J. B. et al.. Nanofibras eletrofiadas e suas aplicações: Avanços na última década. **Quim. Nova**, v.44, n.6, p. 717-736, 2021.
- NEMATI, S.; KIM, SE-JEONG, SHIN, Y. M. et al. Current Progress In application of polymeric nanofibers to tissue engineering. **Nano convergence**, 2019.
- KAMOUN, E.A.; KENAWY, EL-REFAIL.S.; XIN, C. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA- based hydrogel dressings. **Journal of advanced research**, 2017.
- PEREZ, D. S. Análise histológica do processo de reparo epitelial em calvária de rato pelo uso de curativos. Dissertação ao programa de pós-graduação em odontologia, UFMS, 2017.
- PEREIRA, A.L. BACHION, M.M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev Bras Enferm.*, v.58, n.2, p.208-213, 2005.

SANTOS, A. P.; SANTOS, A. M.; CARVALHO, A. R. et al. Estudo sobre a eficácia do AGE e hidrocoloide no tratamento de feridas superficiais com sem infecção. **Ciências biológicas e da saúde, Unit**, v.4, n.2, p.25-34, 2017.

STOJKO, M.; WLODARCZYK, J.; SOBOTA, M. Biodegradable electrospun nonwovens releasing propolis as promising dressing material for burn wound treatment. **Pharmaceutics**, v.12, 2020.

VILCHEZ, A.; ACEVEDO, F.; CEA, M. et al. Applications of eletrospun nanofibers with antioxidant properties: A review. **Nanomaterials**, v.10, n.175, 2020.

WENG, T.; WU, P.; ZHANG, W. et al. Regeneration of skin appendages and nervos: current status an further challenges *Journal of Translational Medicine*, 2020.

ZAMANI, M.; SHAKHSSALIM, N.; RAMAKRISHANA, S. Eletrospinning Aplicacion and prospects for urologic Tissue engineering. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v.8, 2020.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diante dos resultados obtidos que compõem esta tese, pode-se concluir que:

- A eletrofiação é uma técnica eficiente e promissora para produção de hidrogéis usados como curativos.
- As características físico-químicas dos hidrogéis de álcool polivinílico (PVA) associado à própolis se mostraram satisfatórias para a utilização destes como curativos, necessitando de alguns ajustes nos parâmetros da eletrofiação para deixar as nanofibras mais uniformes.
- A concentração da própolis utilizada na solução para produção dos hidrogéis eletrofiados, não apresentou características citotóxicas.
- Os hidrogéis de PVA com própolis produzidos neste experimento apresentaram uma resposta cicatricial mais eficiente em relação aos hidrocolóides.
- Não houve diferença do processo de cicatrização dos hidrogéis de PVA/própolis eletrofiados e submetidos a ciclos de congelamento e descongelamento.

ANEXOS

APÊNDICE A

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA DAS FERIDAS CUTÂNEAS

Dias de avaliações	Coloração da ferida	Bordas da ferida*	Edema*	Presença de Secreção* (especificar o tipo)	Dimensão da ferida (cm)
DIA 0					
DIA 1					
DIA 2					
DIA 3					
DIA 4					
DIA 5					
DIA 6					
DIA 7					
DIA 8					
DIA 9					
DIA 10					
DIA 11					
DIA 12					
DIA 13					
DIA 14					
DIA 15					
DIA 16					
DIA 17					
DIA 18					
DIA 19					
DIA 20					
DIA 21					60

DIA 22					
DIA 23					
DIA 24					
DIA 25					
DIA 26					
DIA 27					
DIA 28					
DIA 29					
DIA 30					

OUTRAS OBSERVAÇÕES: