



**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos**  
**Programa de Pós-graduação em Engenharia Química**  
**Grupo de Engenharia Genômica e Engenharia Tecidual**  
**Laboratório de Tecnologias Integradas - Intelab**

**Camila Quinetti Paes Pittella**

**DESENVOLVIMENTO DE *SCAFFOLD* DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA COM MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE PARA  
APLICAÇÕES TÓPICAS**

**Florianópolis**  
**2017**



**Camila Quinetti Paes Pittella**

**DESENVOLVIMENTO DE *SCAFFOLD* DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA COM MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE PARA  
APLICAÇÕES TÓPICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Luismar Marques Porto

**Florianópolis  
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Pittella, Camila Quinetti

Desenvolvimento de *Scaffold* de Nanocelulose Bacteriana com Modificação de Superfície para Aplicações Tópicas / Camila Quinetti Pittella ; orientador, Luismar Marques Porto. – Florianópolis, SC, 2017.

144 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Nanocelulose bacteriana. 3. Poli-l-lisina-colesterol. 4. Engenharia tecidual. I. Porto, Luismar Marques.vII. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Camila Quinetti Paes Pittella

**DESENVOLVIMENTO DE *SCAFFOLD* DE NANOCELULOSE  
BACTERIANA COM MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE PARA  
APLICAÇÕES TÓPICAS**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
**Orientador**

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cíntia Soares  
**Coordenadora do POSENQ**

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
**Orientador, Presidente**

---

Dra. Janice Koepp  
**Membro externo**

---

Profa. Dra. Patrícia Poletto  
**Membro interno**

---

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo  
**Membro externo**

**Florianópolis  
2017**



*Dedico este trabalho às minhas filhas  
Helena e Joana, a alegria dos meus  
dias.*



*"Nothing in life is to  
be feared, it is only to be understood.  
Now is the time to understand more,  
so that we may fear less." Marie  
Curie.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e saúde.

Às minhas filhas Helena e Joana, doçuras que vieram para dar mais graça à árdua trajetória do doutorado, meus motivos de concentração e objetividade na reta final. Ao meu amado Fred, minha fonte de inspiração: esta conquista é sua também! Obrigada pelos infinitos conselhos, pelas cobranças, por ter tido paciência para discutir resultados até mesmo na mesa do café da manhã.

Aos meus pais, Enius e Régila, pelo amor, pela criação e educação, por acreditarem e apoiarem os meus sonhos. Em especial à minha mãe, que abriu mão de seu conforto para estar ao meu lado na reta final do doutorado, cuidando com todo carinho do meu bem mais precioso para que eu pudesse finalizar este trabalho. À minha amada irmã Fernanda e meu cunhado Henrique, por sua amizade e torcida. Aos meus sogros, Sr. Narciso e D. Flora (presente no coração), que sempre vibraram pelas minhas conquistas. Aos demais familiares, obrigada por todo incentivo constante!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luismar Marques Porto, por ter acreditado em meu potencial. Obrigada pelo incentivo e por não ter deixado eu desistir nos momentos de dificuldade. Eu venci, amadureci e certamente agora tenho “aquele” diferencial que você tanto falava.

Aos alunos do InteLab, pela ajuda e suporte em todo o período, especialmente durante a execução do ensaio clínico. Em especial à amiga Samara, por ter passado noites comigo estudando cinética, engenho e afins. Eu não teria conseguido sem a sua preciosa ajuda. À Júlia, Fernanda, Lya e Cami, obrigada pela amizade durante os meus anos maravilhosos morando em Floripa.

Ao Professor Dr. Carlos Renato Rambo, pelo suporte e pela orientação na elaboração e execução do teste clínico.

À Prof. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse executar os meus experimentos na UFJF. O seu apoio foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos alunos e colaboradores do NUPICS/UFJF, pelo suporte durante toda a caminhada experimental, em especial aos alunos Alexandre Lataliza e César Caneschi. Ao Hudson Polinini, pela parceria durante sua breve passagem em Floripa e pela ajuda nas análises estatísticas do teste clínico.

Aos alunos e professores do LDNano/UFJF, pelo suporte na reta final do trabalho. Aos queridos alunos de iniciação científica e mestrado que estavam sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso. Em especial à Kézia e Bia pelo auxílio nos experimentos de biologia molecular e à Fernanda pelo suporte técnico computacional.

Ao Dr. Hyun-Jin Kim da Universidade de Tokyo (Japão) pela doação do polímero utilizado nesta tese.

À Profa. Dra Maria Leticia de Castro Barbosa pelo auxílio na execução e análise crítica dos resultados de espectroscopia, realizados na UFRJ.

Ao Dr. Humberto de Mello Brandão por ter possibilitado a execução das análises no laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora). À pesquisadora Camila Guimarães de Almeida pelo manuseio do AFM e DLS.

À CENTRALBIO/UFJF/CT-INFRA/Pró-Equipamentos-CAPES por disponibilizar o microscópio de fluorescência para análise de minhas amostras.

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com esta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter possibilitado o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES, e FINEP pelo suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

A Engenharia de tecidos é uma abordagem com particular relevância no tratamento de feridas, pois é considerada uma tecnologia biomédica promissora que visa a regeneração de tecidos danificados. No entanto, barreiras para a utilização de biomateriais como substituintes de tecidos incluem a adesão de células ao arcabouço exógeno e a proliferação destas, muitas vezes limitando o seu uso. Visando o desenvolvimento de scaffolds funcionais para aplicações tópicas, esta tese está dividida em duas partes: a primeira está relacionada ao desenvolvimento de um scaffold de nanocelulose bacteriana (BNC) com superfície modificada pela adsorção de Poli-L-Lisina-Colesterol (PLC), aqui denominado BNC-PLC. O objetivo principal desta parte é modificar eletrostaticamente a superfície da BNC, para favorecer a interação com as células. O polímero PLC, recém sintetizado e ainda inédito na literatura, foi caracterizado quanto à ressonância magnética nuclear (RMN), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética. O scaffold foi desenvolvido e caracterizado quanto à espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de força atômica (AFM). A biocompatibilidade da BNC-PLC foi analisada através do teste de citotoxicidade direta em fibroblastos L929 e através das análises da morfologia, atividade metabólica, adesão celular e expressão gênica por RT-PCR em tempo real de fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas. Quanto à caracterização da PLC, os espectros de RMN confirmaram a presença do grupo colesterol ligado covalentemente à lisina, na proporção de 30%. A análise de DLS confirmou a formação de nanopartículas de diâmetro hidrodinâmico médio em 59 nm e índice de polidispersão de 0,427 em solução aquosa, O potencial zeta apresentado foi de 48 mV. As análises para caracterização da BNC-PLC confirmaram a presença do polímero adsorvido na superfície da membrana e ausência de nanopartículas depositadas, indicando que o polímero se desenovela e expõe as moléculas de colesterol sobre as fibras da BNC. As análises de biocompatibilidade revelaram a ausência de toxicidade e aumento da atividade metabólica e adesão de fibroblastos humanos primários. A análise por PCR em tempo real indicou um aumento significativo da expressão de colágeno, integrina  $\alpha 1$  e integrina  $\alpha 2$  nos fibroblastos cultivados sobre a BNC-PLC comparado à BNC. Dadas as suas características e compatibilidade celular, o scaffold desenvolvido apresenta potencial para a regeneração tecidual da pele, mais especificamente para aplicação tópica no

tratamento de feridas.

A segunda parte desta tese descreve os resultados da elaboração e execução de um protocolo de estudo clínico fase I para avaliar a segurança de aplicação tópica de membranas de nanocelulose bacteriana. Neste estudo foram utilizadas como modelo membranas de BNC incorporadas com *Aloe vera*, aqui denominadas BNC-Aloe. No teste de segurança e inocuidade da BNC-Aloe, observou-se que nenhuma das pessoas voluntárias desenvolveu qualquer sinal e sintoma de alergia ao produto. A pele no local de aplicação manteve-se íntegra, sem a presença de eritema, ressecamento, descamação, calor, bolhas, relatos de dor ou prurido. Os resultados dos parâmetros bioquímicos do sangue e urinálise também não apresentaram alteração significativa. Diante do exposto, não houveram evidências clínicas de toxicidade da membrana BNC-Aloe e conclui-se que o biomaterial desenvolvido é seguro para aplicação em humanos.

**Palavras-chave:** Nanocelulose bacteriana, Poli-L-Lisina-Colesterol, *Aloe vera*, cicatrização, engenharia tecidual.

## ABSTRACT

Tissue engineering is a particularly relevant approach to wound treatment, as it is a promising biomedical technology aimed at regenerating damaged tissue. However, barriers to the use of biomaterials as tissue substituents include cell adhesion to the exogenous scaffold and proliferation, often limiting its use. Aiming at the development of functional scaffolds for topical applications, this thesis is divided into two parts: the first one is related to the development of a scaffold of bacterial nanocellulose (BNC) for topical application, with surface modification by the adsorption of Poly-L-lysine-cholesterol (PLC), herein called BNC-PLC. The main objective of this part is to electrostatically modify the surface of BNC, to improve the interaction with cells. The recently synthesized polymer PLC has been characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility. The scaffold was developed and characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and atomic force microscopy (AFM). The biocompatibility of BNC-PLC was analyzed by the direct cytotoxicity test in L929 fibroblasts and through analyzes of cell morphology, metabolic activity, adhesion and gene expression by real-time RT-PCR of primary human fibroblasts cultured on the membranes. As for PLC characterization, the NMR spectra confirmed the presence of the cholesterol group covalently bound to lysine in the proportion of 30%. The DLS analysis confirmed the formation of nanoparticles with average hydrodynamic diameter of 59nm with polydispersion index of 0,427 in aqueous solution and zeta potential of 48 mV. The BNC-PLC characterization confirmed the presence of the polymer adsorbed on the surface of the membrane and absence of nanoparticles deposited on the surface of the BNC, indicating that the polymer adsorbs to the surface and exposes the cholesterol molecules. Biocompatibility analyzes revealed the absence of toxicity and increased metabolic activity and adhesion of primary human fibroblasts. Real-time PCR analysis indicated a significant increase in the expression of collagen,  $\alpha 1$  integrin and  $\alpha 2$  integrin in fibroblasts cultured on BNC-PLC compared to BNC. Given its characteristics and cellular compatibility, the developed scaffold presents potential for the tissue regeneration of the skin, more specifically for topical application in wound healing purposes. The second part of this thesis describes the results of the elaboration and execution of a phase I clinical study protocol to evaluate the safety of topical application of bacterial nanocellulose membranes. In this study BNC membranes incorporated

with *Aloe vera*, herein denominated BNC-Aloe, were used as sample model. In the safety and harmlessness test of BNC-Aloe, it was observed that none of the volunteers developed any signs and symptoms of allergy to the product. The skin at the application site remained intact without the presence of erythema, dryness, scaling, heat, blisters, reports of pain or itching. The results of the blood biochemical parameters and urinalysis also did not present significant alteration. Therefore, there was no clinical evidence of BNC-Aloe membrane toxicity and it could be concluded that the developed biomaterial is safe for human application.

**Key words:** Bacterial nanocellulose, Poly-L-lysine-cholesterol, *Aloe vera*, wound healing, tissue engineering.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>31</b>
1.1 OBJETIVOS.....	32
1.1.1 Objetivo geral.....	32
1.1.2 Objetivos específicos.....	32
1.2 ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO .....	33
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>35</b>
2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS .....	35
2.2 A PELE HUMANA E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....	38
2.3 <i>SCAFFOLDS</i> COMO PRODUTO DE ENGENHARIA DE TECIDO EPITELIAL PARA APLICAÇÃO TÓPICA: ESTADO DA ARTE .....	41
2.4 NANOCELULOSE BACTERIANA COMO BIOMATERIAL ADJUVANTE DA CICATRIZAÇÃO .....	44
2.5 MODIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES NA ENGENHARIA DE TECIDOS .....	49
2.6 DO DESENVOLVIMENTO DO PRODUTO À APLICAÇÃO EM HUMANOS: TESTES CLÍNICOS .....	53
<b>3. DESENVOLVIMENTO DE SCAFFOLD DE NANOCELULOSE BACTERIANA MODIFICADO COM POLI-L-LISINA- COLESTEROL</b> .....	<b>55</b>
3.1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	55
3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	58
3.2.1 Produção e purificação de membranas de nanocelulose bacteriana .....	58
3.2.2 Preparação de membranas de nanocelulose bacteriana com superfície modificada através da adsorção de poli- L-lisina-colesterol (BNC-PLC) .....	58
3.2.2.1 Caracterização da Poli-L-Lisina-Colesterol.....	58
3.2.2.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	58
3.2.2.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	59
3.2.2.1.3 Mobilidade eletroforética (potencial zeta).....	59
3.2.2.2 Modificação da superfície da membrana de nanocelulose bacteriana .....	59
3.2.2.2.1 Adsorção de Poli-L -Lisina-Colesterol .....	59
3.2.2.3 Caracterização das membranas de nanocelulose com superfície modificada.....	60
3.2.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR) .....	60
3.2.2.3.2 Microscopia de força atômica (AFM) .....	60

3.2.3 Análise da biocompatibilidade <i>in vitro</i> da membrana de nanocelulose bacteriana com superfície modificada .....	61
3.2.3.1 Preparação das amostras para os ensaios <i>in vitro</i> .....	61
3.2.3.2 Citotoxicidade direta .....	61
3.2.3.3 Cultura de células epiteliais .....	62
3.2.3.3.1 Semeadura de Fibroblastos humanos dermais primários (HDF) .....	62
3.2.3.3.2 Cocultura de Fibroblastos humanos dermais primários (HDF) e Queratinócitos humanos (linhagem Hacat) .....	63
3.2.3.3.2.1 Modelo de semeadura simultânea .....	63
3.2.3.3.2.2 Modelo organotípico .....	64
3.2.3.4 Análise da morfologia celular .....	64
3.2.3.5 Análise da atividade metabólica (MTS) .....	64
3.2.3.6 Análise da viabilidade celular (Live and dead) .....	65
3.2.3.7 Análise da adesão celular .....	66
3.2.3.8 Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real .....	66
3.2.3.8.1 Extração de RNA: desenvolvimento de protocolo otimizado .....	67
3.2.3.8.2 Síntese de cDNA e amplificação dos genes .....	68
3.2.3.9 Análise estatística .....	69
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
3.3.1 Caracterização da poli-L-lisina-colesterol (PLC) .....	69
3.3.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	69
3.3.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética (potencial zeta) .....	71
3.3.2 Caracterização das membranas de nanocelulose com superfície modificada .....	72
3.3.2.1 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR) .....	72
3.3.2.2 Microscopia de força atômica (AFM) .....	74
3.3.3 Análise da biocompatibilidade <i>in vitro</i> da membrana de nanocelulose bacteriana com superfície modificada .....	77
3.3.3.1 Citotoxicidade direta .....	77
3.3.3.2 Análise da morfologia celular .....	78
3.3.3.2.1 Cultura de Fibroblastos humanos dermais primários (HDF) .....	78
3.3.3.2.2 Modelo de cocultura em semeadura simultânea .....	80
3.3.3.2.3 Modelo de cocultura organotípico .....	82
3.3.3.3 Análise da atividade metabólica (MTS) .....	83
3.3.3.4 Análise da viabilidade celular qualitativa (live and dead) .....	87
3.3.3.5 Análise da adesão celular .....	90
3.3.3.6 Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real .....	93
3.3.3.6.1 Extração de RNA .....	93

3.3.3.6.2 Amplificação dos genes.....	95
3.4 CONCLUSÕES.....	99
<b>4. ANÁLISE DA SEGURANÇA DE APLICAÇÃO TÓPICA DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA: TESTE CLÍNICO FASE I.....</b>	<b>101</b>
4.1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	101
4.2 METODOLOGIA .....	103
4.2.1 Tipo de estudo .....	103
4.2.2 População .....	103
4.2.3 Variáveis mensuradas.....	104
4.2.4 Produção e preparação das membranas de BNC .....	104
4.2.5 Instrumento de coleta de dados .....	105
4.2.6 Coleta de dados .....	105
4.2.7 Aspectos éticos.....	107
4.2.8 Análise estatística.....	107
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	107
4.4 CONCLUSÕES.....	116
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>6. APÊNDICES.....</b>	<b>129</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Figura representativa da pele, mostrando os seus componentes e camadas.....	39
Figura 2: Representação esquemática das sub-unidades de integrinas e os seus receptores de matriz extracelular específicos.....	41
Figura 3: Substituto de pele em bicamada, Apligraf <sup>®</sup> .....	42
Figura 4: Estrutura química da celulose.....	45
Figura 5: Membrana de BNC hidratada.....	45
Figura 6: Aplicação de membranas de BNC para tratamento de queimaduras. ....	47
Figura 7: Representação esquemática de métodos de modificação da BNC. (A) modificação <i>in situ</i> da BNC, na qual a composição do meio de cultura é alterado, geralmente com a adição de outros materiais. B) Modificação <i>ex situ</i> , em que a BNC é modificada por tratamento químico ou por adsorção de outros compostos após a membrana ter sido formada. ....	50
Figura 8: Estrutura química da poli-L-lisina-colesterol; inserção de 30% de colesterol. ....	56
Figura 9: Representação esquemática da hipótese descrita para a modificação da superfície da BNC através da adsorção de poli-L-lisina-colesterol. ....	57
Figura 10: Membrana de nanocelulose hidratada em meio DMEM.....	61
Figura 11: Fibroblastos semeados em membrana de nanocelulose hidratada em meio DMEM.....	63
Figura 12: Desruptor de célula ultrassônico modelo DE500 (Unique) utilizado para rompimento mecânico da membrana de nanocelulose bacteriana celularizada.....	68

Figura 13: A) estrutura química de PLC com marcação de prótons para identificação; B) espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de PLC em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ..... 70

Figura 14: Histograma de distribuição de tamanho por intensidade determinado por medidas de DLS das nanopartículas de PLC formadas em água.....71

Figura 15: Fotografia das membranas BNC e BNC-PLC. Os poços superiores mostram membranas hidratadas em meio DMEM e abaixo membranas liofilizadas (BNC à esquerda, BNC-PLC à direita)..... 72

Figura 16: Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do polímero PLC e das membranas BNC e BNC-PLC. ....73

Figura 17: Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da superfície das membranas de nanocelulose pura (BNC) e com superfície modificada (BNC-PLC). A e B) Imagem topográfica da BNC em 2D e 3D, respectivamente. C e D) Imagem topográfica da BNC-PLC em 2D e 3D, respectivamente.....75

Figura 18: Imagem 2D ampliada da superfície superior da membrana de nanocelulose modificada (BNC-PLC). Barra corresponde a  $1\ \mu\text{m}$ .....76

Figura 19: Imagem de AFM do trabalho de Mandal e Chakrabarty (2015) mostrando a presença de nanopartículas (círculos verdes) na superfície de biofilme de Polivinil-alcool/ poliacrilamida-nanocelulose.....76

Figura 20: Atividade metabólica de células L929 cultivadas em contato direto com membranas BNC e BNC-PLC durante 7 dias.  $*P < 0.05$ .....77

Figura 21: Micrografias representativas dos Fibroblastos humanos primários (HDF) cultivados nas membranas BNC e BNC-PLC ao longo de 7 dias (Aumento de 10x; barras correspondem a  $100\ \mu\text{m}$ ).....79

Figura 22: Micrografias representativas dos Fibroblastos humanos primários (HDF) cultivados nas membranas BNC (A) e BNC-PLC (B) por 7 dias (Aumento de 100x; barras correspondem a  $100\ \mu\text{m}$ ).....79

Figura 23: Micrografias representativas dos fibroblastos (setas brancas) e queratinócitos (setas pretas) em cocultura por 48 horas. Imagem obtida através de imagem de microscópio Nikon Eclipse E200. (A) micrografia original (4x) e (B) micrografia ampliada (10x).....80

Figura 24: Micrografias representativas dos Queratinócitos HacaT e Fibroblastos primários (HDF) em modelo de cocultura simultânea nas membranas BNC e BNC-PLC por um período de 7 dias. Aumento e 10x).....81

Figura 25: Micrografias representativas dos Queratinócitos HacaT e Fibroblastos primários (HDF) em modelo de cocultura organotípica nas membranas BNC e BNC-PLC por um período de 7 dias. Aumento de 10x).....83

Figura 26: Atividade metabólica de fibroblastos humanos primários cultivados sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.....84

Figura 27: Atividade metabólica de queratinócitos humanos cultivados sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.....85

Figura 28: Atividade metabólica de fibroblastos e queratinócitos humanos cocultivados simultaneamente sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.....86

Figura 29: Atividade metabólica de fibroblastos e queratinócitos humanos cocultivados em modelo organotípico sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.....87

Figura 30: Fibroblastos humanos primários metabolicamente ativos após 7 dias de cultivo sobre as membranas de nanocelulose BNC (controle) e BNC-PLC. As células vivas estão coradas em verde (calceína) e as células mortas estão coradas em vermelho.....89

Figura 31: Fibroblastos humanos primários e Queratinócitos humanos em modelo de cocultura organotípica metabolicamente ativos após 7 dias de cultivo sobre as membranas de nanocelulose BNC (controle) e BNC-PLC. As células vivas estão coradas em verde e as células mortas estão coradas em vermelho.....90

Figura 32: Capacidade de adesão de Fibroblastos humanos primários às membranas de nanocelulose BNC e BNC-PLC ao longo do tempo (análise em 30, 60 e 120 min). \* $p < 0,001$ ; Two way Anova e Bonferroni Post hoc test.....91

Figura 33: Micrografias representativas da adesão de Fibroblastos humanos primários às membranas de nanocelulose BNC e BNC-PLC ao longo do tempo (micrografias representativas em 0, 30, 60 e 120 min; aumento 10X) .....93

Figura 34: Análise da expressão de colágeno (*Col1A1*) em Fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose por um período de 24h. Os resultados foram normalizados a partir da expressão do gene  $\beta$ -actina. Os valores foram apresentados como % de expressão relativa ao controle. \* $p < 0,05$  ANOVA e Teste de Tukey.....97

Figura 35: Análise da expressão de Integrina  $\alpha 1$  (*Itga1*) em Fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose por um período de 24h. Os resultados foram normalizados a partir da expressão do gene  $\beta$ -actina. Os valores foram apresentados como % de expressão relativa ao controle. \* $p < 0,05$  ANOVA e Teste de Tukey.....97

Figura 36: Análise da expressão de Integrina  $\alpha 2$  (*Itga2*) em Fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose por um período de 24h. Os resultados foram normalizados a partir da expressão do gene  $\beta$ -actina. Os valores foram apresentados como % de expressão relativa ao controle. \* $p < 0,05$  ANOVA e Teste de Tukey.. .....98

Figura 37: Placas nomeadas (A, B, C e D) contendo os hidrogéis a serem aplicados nos voluntários.....	106
Figura 38: Esquema de aplicação dos hidrogéis nos voluntários com filme de poliuretano (Tegaderm®) usado para proteção da área aplicada .....	106
Figura 39: Fluxograma CONSORT mostrando o fluxo de pacientes no estudo.....	108
Figura 40: Evolução normal da aplicação dos hidrogéis ao longo do teste. Em evidência: grupo BNC-Aloe-40.....	111
Figura 41: Evolução atípica com presença de sintomas iniciais de alergia em região circunscrita ao filme de poliuretano e posterior regressão dos sintomas. As setas pretas indicam as áreas afetadas (nas semanas 1 e 2).....	112



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: <i>Overview</i> de órgãos desenvolvidos através da engenharia de tecidos.....	35
Tabela 2: Substitutos de pele aprovados pelo U.S. Food and Drug Administration.....	43
Tabela 3: Propriedades das membranas de BNC e a sua correlação com as funções ideais de um biomaterial usado para a reparação de tecidos.....	46
Tabela 4: Membranas de BNC disponíveis no mercado para reparo de tecidos.....	48
Tabela 5: Primers a utilizados no estudo de expressão gênica.....	68
Tabela 6: Concentração e grau de pureza do RNA total extraído de Fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose bacteriana BNC e BNC-PLC. As células cultivadas na placa de poliestireno foram utilizadas como controle.....	95
Tabela 7: Dados demográficos.....	108
Tabela 8: Análise da frequência dos efeitos adversos entre os grupos durante a aplicação dos hidrogéis.....	110
Tabela 9: Resultados das análises de hemograma, testes bioquímicos e urinálise de pessoas voluntárias sadias no início e no final das aplicações. Resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão; * $p \leq 0,05$ comparado ao respectivo controle; ** $p \leq 0,05$ comparado ao valor inicial (antes da aplicação dos hidrogéis) .....	113



## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2D - Duas dimensões  
3D - Três dimensões  
AFM - microscopia de força atômica  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
BNC - Bacterial nanocellulose  
BNC-Aloe - Bacterial nanocellulose - *Aloe vera*  
BNC-PLC - Bacterial nanocellulose - Poli-L-lisina-colesterol  
BNC/PEG (polietilenoglicol)  
CCT - Coleção da Cultura Tropical  
CD<sub>3</sub>OD. - metanol deuterado  
CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais  
CH - Chitosana  
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média  
CHO - ovário de hamster chinês  
CONSORT - Consolidated Standards of Randomized trials  
DLS - espalhamento dinâmico de luz  
DMEM - Dulbecco's modified Eagles's Medium  
ET - Engenharia de tecidos  
FDA - Food and a Drug Administration  
FTIR - espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier  
FTIR-ATR - Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada  
H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
HA - hidroxiapatita  
HDF - Human dermal fibroblasts  
IMC - Índice de massa corporal  
MEC - matriz extracelular  
MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio/PMS)  
MTT - (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)  
PBS - Phosphated buffered saline  
PCR - Reação em cadeia da polimerase  
PLC - Poli-L-lisina-colesterol  
SFB - soro fetal bovino  
TMS - tetrametil-silano  
VCM - volume corpuscular médio  
ε-PLL - ε-poly-L-lysine



## 1. INTRODUÇÃO

A morbidade e mortalidade decorrente de úlceras crônicas de diversas origens são problemas de saúde pública significativos (EMING et al., 2002). A perda de grandes porções de pele devido à queimaduras, acidentes e doenças pode resultar em deficiências severas e até mesmo a morte (PRIYA et al., 2008). Apesar da maioria das feridas de pele cicatrizar naturalmente, feridas extensas, crônicas e irreversíveis necessitam de uma cobertura especial ou algum substituto de pele para auxiliar o reparo e a regeneração. Apesar dos avanços clínicos no tratamento de feridas, o impacto econômico e social de feridas sem tratamento continua crescendo (DINI et al., 2006), demandando novas estratégias e alternativas tanto para prevenir como para tratar esta carência médica (WONG E GURTNER, 2012).

Atualmente incluem-se como opções de tratamento para as grandes perdas de pele os substitutos cutâneos, sejam eles de pele humana ou de origem sintética. Exemplos disso são os aloenxertos (derivados da pele de cadáver), os xenoenxertos (derivados da pele de animais) ou os sintéticos (construídos por engenharia de tecidos). A decisão de qual substituto cutâneo empregar é determinada por fatores como tipo, tamanho e profundidade da ferida, comorbidades presentes, preferências do paciente e experiência do cirurgião (FERREIRA et al., 2011).

A engenharia de tecidos tornou-se uma abordagem com particular relevância no tratamento de feridas, pois é considerada uma tecnologia biomédica promissora que visa a reparação e a regeneração de tecidos danificados (LANGER E VACANTI, 1993). Esta é uma tecnologia emergente e possui algumas aplicações clínicas iniciais encorajadoras. As potenciais implicações para o tratamento do paciente e impacto econômico são enormes (VACANTI, 2001).

De acordo com estudos anteriores, a nanocelulose bacteriana (BNC) tem sido utilizada como substrato na engenharia de tecidos devido às suas propriedades físico-químicas ideais (WATANABE E KONDO, 2012). Nesse contexto, a BNC vem sendo amplamente explorada como material de suporte para o crescimento celular (*scaffold*) e regeneração de vários tecidos, e possui potencial para se tornar uma excelente plataforma tecnológica para medicina (CZAJA et al., 2006).

Visando o desenvolvimento de *scaffolds* funcionais para aplicações tópicas, a presente tese apresenta uma modificação inédita na

superfície da nanocelulose bacteriana (BNC), utilizando a adsorção do polímero Poli-L-Lisina-Colesterol (PLC) para aumentar a eficiência de adesão e proliferação celular ao biomaterial, características essenciais na utilização de biomateriais em engenharia de tecidos, utilizando simultaneamente dois tipos de interações intermoleculares distintas: interação eletrostática e hidrofóbica. Além disso, no intuito de avançar, de testes pré-clínicos aos testes clínicos e criar um protocolo modelo de testes destes biomateriais em humanos, foi desenvolvido e testado um protocolo de estudo clínico fase I para avaliar a aplicação tópica de membranas de nanocelulose bacteriana.

Desta forma, esta tese está dividida em duas partes: a primeira está relacionada ao desenvolvimento do *scaffold* de BNC superfície modificada pela adsorção de um polímero inédito na literatura - Poli-L-Lisina-Colesterol (PLC), aqui denominado BNC-PLC. A segunda parte descreve os resultados da elaboração e execução de um protocolo de estudo clínico fase I para avaliar a segurança de aplicação de membranas de BNC em humanos, utilizando como modelo membranas previamente desenvolvidas através da incorporação de *Aloe vera* (BNC-Aloe).

---

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Desenvolver um *scaffold* de nanocelulose bacteriana com modificação de superfície para aplicações tópicas

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o polímero poli-l-lisina-colesterol;
- Produzir membranas de nanocelulose bacteriana (BNC) com superfície modificada através da incorporação de homopolímero poli-l-lisina-colesterol (PLC);
- Caracterizar o *scaffold* BNC-PLC;
- Estabelecer condições para a cocultura de fibroblastos e queratinócitos nas membranas BNC e BNC-PLC;
- Avaliar a morfologia, atividade metabólica e adesão das células cultivadas sobre as membranas;
- Estabelecer um protocolo para extração eficiente de RNA das células cultivadas sobre as membranas;
- Analisar a expressão gênica de integrina e colágeno em fibroblastos cultivados sobre as membranas;

- Elaborar e executar um protocolo de estudo clínico fase I para analisar a segurança de aplicação tópica de compósitos de BNC, utilizando a BNC-Aloe como modelo.

---

## 1.2 ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho está estruturado em 6 capítulos como descrito a seguir:

- 1- Introdução sobre o conteúdo desta tese e objetivos a serem atingidos;
- 2- Fundamentação teórica: Revisão bibliográfica contextualizada abordando princípios da engenharia de tecidos, nanocelulose bacteriana, suas modificações e aplicações para o reparo de tecidos e testes clínicos;
- 3- *Desenvolvimento de scaffold de nanocelulose bacteriana modificado com Poli-l-Lisina-Colesterol* - Nesta seção, estão descritos introdução, metodologia, resultados e conclusões do desenvolvimento e caracterização do scaffold BNC-PLC.
- 4- *Análise da segurança de aplicação tópica de membranas de nanocelulose bacteriana: teste clínico fase I* - nesta seção estão descritos introdução, metodologia, resultados e conclusões do desenvolvimento do protocolo de teste clínico fase I para análise da segurança de aplicação das membranas BNC, utilizando como modelo as membranas BNC-Aloe aplicada em voluntários saudáveis
- 5- Referências bibliográficas;
- 6- Apêndices.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS

Nas últimas três décadas têm-se visto o surgimento de uma ciência denominada engenharia de tecidos (ET) no qual cientistas, engenheiros e médicos aplicam ferramentas de diversos campos para a construção de substitutos biológicos que se assemelhem a tecidos para fins de diagnóstico e pesquisa, e eventualmente possam substituir (ou ajudar a regenerar) tecidos doentes e lesionados (BERTHIAUME et al. 2011).

No contexto da Medicina Regenerativa a ET foi abordada por muitos anos como um dos temas mais importantes da medicina no século XXI. As aplicações da ET podem ser amplamente classificadas em aplicações terapêuticas, onde o tecido é cultivado dentro ou fora do paciente e posteriormente transplantado; e aplicações de diagnóstico, em que o tecido é desenvolvido *in vitro* e utilizado para testes de metabolismo de droga, absorção, toxicidade, patogenicidade, etc (GRIFFITH, 2002). Enquanto os primeiros esforços clinicamente relevantes da ET estiveram principalmente preocupados com a geração de substitutos de pele "bioengenhairadas", subsequentemente outras aplicações têm sido continuamente estendidas para uma ampla variedade de tecidos e órgãos (HORCH et al., 2012). Os principais alvos são os tecidos que estão propensos a lesões, doenças e degeneração. Alguns órgãos que têm sido foco no desenvolvimento de equivalentes na engenharia de tecidos estão listados na tabela 1.

Tabela 1: *Overview* de órgãos desenvolvidos através da engenharia de tecidos.

Órgão	Função	Abordagens	Desafios
Pele	Barreira do corpo	Matriz implantada para orientação da regeneração; implantes com células autólogas ou alogênicas	Falta de elementos estruturais, processo lento para crescimento das células, pobre vascularização
Córnea	Barreira transparente para os olhos	Implante de matrizes; matriz extracelular produzida por células cultivadas <i>ex vivo</i>	Manter a transparência e as propriedades de barreira da matriz
Fígado	Desintoxicação e produção de	Hepatócitos xenogênicos,	Fonte celular, manutenção da

	proteínas específicas do fígado	alogênicos ou derivados de fontes celulares; ou hepatoma imortalizado semeado em matrizes implantáveis;	função hepática, alta densidade de células, vascularização dos implantes
Pâncreas	Secreta insulina para manter a homeostase de glicose	Transplante de ilhotas livres ou encapsuladas	Escolha do local do transplante, vascularização, fonte de células, rejeição imunológica
Cartilagem	Componente crítico das articulações	Matriz implantada para orientar regeneração; implantes com células alogênicas ou autólogas	Processo lento de crescimento de células, controle de diferenciação celular, durabilidade a longo prazo
Coração	Promove a circulação do sangue	Materiais incluindo órgãos decelularizados semeados com células tronco e progenitoras diferenciadas em cardiomiócitos	Tumorigênese, controle da diferenciação celular, integração elétrica
Rim	Regula o volume de fluido corporal, o pH e a excreção de metabólitos	Néfrons derivados de células tronco cultivadas como <i>ex vivo</i>	Seletividade glomerular replicativa, mantendo alta permeabilidade hidráulica
Neurônios e Medula espinhal	Envio de estímulo elétrico para controle das funções do corpo	Materiais em forma de tubos para a orientação da regeneração axonal e células-tronco neurais	Reconectar os axônios adequadamente, controlando ambiente pró-inflamatório, evitando a formação de tecido cicatricial

Fonte: Adaptado de (BERTHIAUME *et al.*, 2011)

Grande parte das abordagens da engenharia de tecidos utiliza células vivas, e o fornecimento suficiente de células é uma questão importante. O processo começa com uma fonte de células derivadas a partir de um paciente ou um doador. As células podem ser imaturas, células tronco, ou células que são já capazes de realizar as funções dos tecidos. As células tronco possuem elevada capacidade proliferativa e de diferenciação em células de múltiplas linhagens, o que as tornam

atraentes para serem derivadas em grandes quantidades de células (BERTHIAUME et al., 2011). Uma característica importante para que a abordagem da engenharia de tecidos seja eficaz é o controle do meio celular, o qual deve mimetizar alguns aspectos críticos do ambiente *in vivo* através do estímulo mecânico e material. Persuadir as células a formar tecido é inerentemente um processo de engenharia, devido ao fato de eles precisarem de um suporte físico (geralmente sob a forma de um *scaffold* 3-D) bem como de sinais químicos e mecânicos aplicados em tempos e locais apropriados para formar as estruturas hierárquicas complexas que caracterizam o tecido nativo (GRIFFITH, 2002).

Outro fundamento importante da ET inclui o *scaffold*, que fornece uma arquitetura no qual as células semeadas podem se organizar e evoluir para o órgão ou tecido desejado antes de serem implantados. *Scaffolds* são estruturas porosas, biodegradáveis, produzidas a partir de materiais naturais ou polímeros sintéticos. Eles podem ser esponjosos, géis ou estruturas altamente complexas com poros intrincados e canais que podem ser fabricados usando novas tecnologias de processamento de materiais (GRIFFITH, 2002).

O *scaffold* fornece um perfil biomecânico inicial para o tecido a ser substituído até que as células produzam uma matriz extracelular adequada durante a formação, deposição, e organização da matriz recém gerada. O *scaffold* é degradado ou metabolizado, eventualmente deixando um órgão vital ou tecido que restaura, mantém ou melhora a função do tecido. O sucesso da organização e desenvolvimento do tecido depende do sucesso na adesão celular, transporte de nutrientes/resíduos, diferenciação celular, viabilidade celular e organização matricial.

O desenvolvimento de tecidos ou órgãos complexos ainda é um desafio nos dias atuais (IKADA, 2006). Os pesquisadores estão focados em quatro pontos principais, os quais necessitam otimização: biomateriais, fontes de células, vascularização dos tecidos (angiogênese), e *drug delivery*. Os biomateriais e as fontes de células devem ser específicos para a engenharia de cada tecido ou órgão. Por outro lado, a angiogênese é necessária não só para o tratamento de uma variedade de condições isquêmicas, mas também é um componente crítico de todas as estratégias de engenharia de tecidos.

Portanto a ET é uma tecnologia emergente e possui algumas aplicações clínicas iniciais encorajadoras. As potenciais implicações para o tratamento do paciente e impacto econômico são enormes. A constante comunicação interdisciplinar e a cooperação entre químicos,

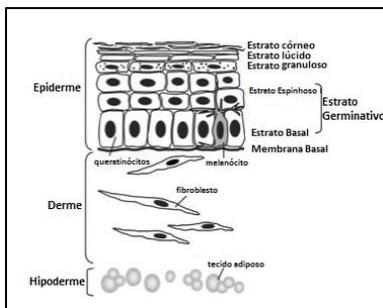
engenheiros, biólogos, cientistas e clínicos é um elemento fundamental (VACANTI, 2001).

## 2.2 A PELE HUMANA E O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

A pele, o maior órgão do corpo humano, é organizada em uma estrutura de camadas formada principalmente pela epiderme, derme e hipoderme. A epiderme consiste de camadas de queratinócitos separadas da derme através da membrana basal. É a camada mais externa da pele, da porção mais interna à superfície; divide-se em subcamadas, sendo: camada basal, estrato espinhoso, granuloso e córneo. É constituída histologicamente por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e sua principal função é a produção de queratina, proteína responsável pela impermeabilidade da pele e prevenção da evaporação de água da superfície corporal (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A derme é composta de matriz extracelular (MEC) (colágeno, elastina e glicosaminoglicanos) e alguns componentes celulares, incluindo os fibroblastos, como pode ser observado na Figura 1. Ela serve de apoio para a epiderme, atuando como elo entre esta e a hipoderme. A presença de colágeno proporciona características de durabilidade e elasticidade à pele e as fibras de elastina conferem propriedades de recuo elástico. Ela é ricamente vascularizada e inervada e, ainda, possui grande quantidade de vasos linfáticos. Além destas estruturas, é na derme que se encontram os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, apesar de estes serem considerados anexos epidérmicos, por terem a mesma origem embriológica (BAUMANN, 2004; VILLARINO e LANDONI, 2006).

Figura 1: Estrutura representativa da pele, mostrando os seus componentes e camadas.



Fonte: adaptado de BROHEM et al., 2011

Existe também uma camada denominada hipoderme subcutânea aonde acontece o armazenamento de tecido adiposo e vários outros apêndices, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, nervos, vasos linfáticos e vasos sanguíneos (BROHEM et al., 2011).

Estes componentes da pele garantem a homeostase através da realização de funções críticas. As funções desempenhadas pela pele são múltiplas, sendo a principal a de proteção contra o atrito e a perda de água. Isso significa que a pele naturalmente apresenta uma baixa permeabilidade para a penetração de moléculas externas, protegendo os tecidos subjacentes de infecções, desidratação e estresse físico e químico (KWON et al., 2015). Ela também participa de outras funções no organismo, como: i) termorregulação por meio de seus capilares sanguíneos, tecido adiposo e glândulas; ii) excreção de substâncias pelo suor; iii) proteção contra os raios ultra-violeta, devido à melanina produzida localmente; iv) aliada à radiação solar, transforma precursores sintetizados no organismo em vitamina D3; e v) enviar informações sensoriais sobre o ambiente para o sistema nervoso central (MITRAGOTRI, 2014; BARRY, 2001).

Diversas situações clínicas, dentre as quais queimaduras, traumatismos, infecções, doenças autoimunes e o que classificamos como feridas complexas, podem resultar na perda completa do revestimento cutâneo. Essa perda da barreira cutânea predispõe a infecções, aumento das perdas insensíveis de água e hipotermia, gerando aumento de morbidade, internações prolongadas com alto custo, e até morte do indivíduo (FERREIRA et al., 2011).

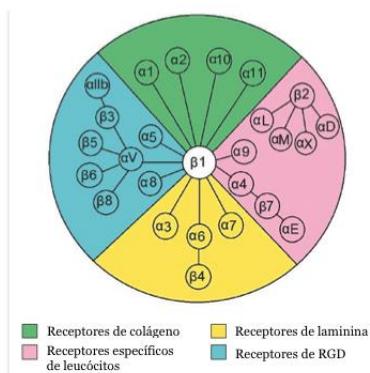
As feridas podem ser classificadas de acordo com as camadas

de tecido envolvidas (espessura parcial e total), os tipos de fechamento (primeira, segunda e terceira intenção) e complexidade (agudas ou crônicas). As feridas crônicas são aquelas que não cicatrizam no tempo esperado, retardando seu reparo e podendo recidivar. Elas são causadas, freqüentemente, por inflamação crônica, alterações vasculares ou danos traumáticos repetitivos. As feridas agudas são geralmente de origem cirúrgica ou traumática, evoluem de forma previsível e rápida até o reparo e resultam em cicatrização efetiva (DOUGHTY, 2007).

O processo de cicatrização ocorre fundamentalmente em quatro fases: i) hemostase, na qual envolve o processo de coagulação sanguínea e formação da rede de fibrina para impedir o sangramento no local da ferida; ii) inflamação, com atração de macrófagos e células inflamatórias para "limpar" a ferida; iii) formação de tecido de granulação e deposição de MEC (fase proliferativa), fase em que ocorrem os processos celulares mediados principalmente por queratinócitos e fibroblastos e iv) remodelação, aonde acontece a contração do tecido neo-formado (GURTNER et al., 2008). Os processos envolvidos na reparação do tecido lesado visam o restabelecimento da homeostasia dos tecidos e a regeneração com a reestruturação da atividade funcional da pele (BALBINO et al., 2005).

A re-epitelização é um processo essencial para a cicatrização de feridas. Esta consiste em três funções primordiais de queratinócitos e fibroblastos: proliferação, migração e diferenciação. A proliferação ocorre nas margens da ferida para fornecer células para migração. Durante a migração, as células migram através do tecido de granulação para formar uma barreira entre a ferida e o ambiente. Por fim, a diferenciação ocorre para formar as camadas estratificadas do novo epitélio (função atribuída apenas aos queratinócitos). Para recuperar a integridade do tecido, a migração e a proliferação são assistidos por receptores essenciais denominados integrinas (PAES et al., 2012). As integrinas são os principais receptores utilizados pelas células animais para se ligar à matriz extracelular. Eles são heterodímeros e funcionam como conectores transmembrana específicos entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de actina (Figura 2). Integrinas e receptores convencionais de sinalização geralmente cooperam entre si para promover o crescimento, a sobrevivência e a proliferação celular (ALBERTS et al., 2012).

Figura 2: Representação esquemática das sub-unidades de integrinas e os seus receptores de matriz extracelular específicos.



Fonte: RIPPA et al., 2013.

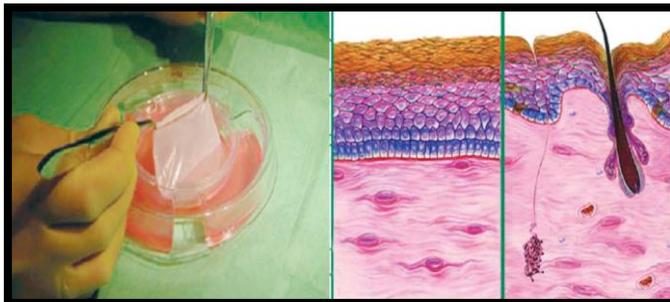
### 2.3 SCAFFOLDS COMO PRODUTO DE ENGENHARIA DE TECIDO EPITELIAL PARA APLICAÇÃO TÓPICA: ESTADO DA ARTE

Como as células que compõem o tecido da pele humana crescem dentro de uma matriz tridimensional (3D), as culturas de célula em monocamada padrão (2D) não reconstituem a arquitetura fisiológica da pele. Substitutos de pele "engenheirados" sugerem a criação de *scaffolds* 3D como matriz extracelular analógica para orientar a adesão celular, crescimento e diferenciação, para que seja formado um tecido funcional e estrutural. Suportes 3D para a engenharia de tecido epitelial podem não só cobrir feridas e fornecer uma barreira física contra a infecção externa, mas também podem fornecer suporte para fibroblastos (células da derme) e queratinócitos (células da epiderme). Um *scaffold* 3D de sucesso deve ter uma estrutura altamente porosa e boa estabilidade mecânica, fornecendo espaço estrutural para alojamento e migração celular e permitindo a troca de nutrientes com o meio ambiente (KIM E KIM, 2007).

Existem no mercado alguns tipos de matrizes para aplicação tópica tais como: matrizes acelulares, matrizes à base de colágeno/ácido hialurônico, matrizes alogênicas cultivadas com queratinócitos autólogos e matrizes inoculadas por diferentes tipos de células (queratinócitos, fibroblastos da derme e células tronco) (WONG E

GURTNER, 2012). Uma forma representativa de um substituto de pele celularizado pode ser observada na Figura 3.

Figura 3: Substituto de pele em bicamada, Apligraf<sup>®</sup>



Fonte: Adaptado de ZHONG et al., 2010.

Uma matriz "engenheirada" ideal para aplicações tópicas deve oferecer:

- ❖ Proteção - através do estabelecimento de uma barreira mecânica contra microorganismos e perda de vapor;
- ❖ Promoção - através do fornecimento de componentes, citocinas e/ou fatores de crescimento que podem promover melhores respostas de cura da ferida;
- ❖ Disposição - de novas estruturas, tais como colágeno ou células cultivadas que são incorporadas à ferida e persistem durante o processo de cicatrização (SHAKESPEARE, 2005).

Diversos produtos têm sido utilizados para o tratamento de feridas agudas extensas (especialmente queimaduras) e de feridas crônicas, tais como úlceras diabéticas e venosas. Alguns produtos médicos que estão disponíveis no mercado, desenvolvidos através da engenharia de tecidos, estão listados na Tabela 2:

Tabela 2: Substitutos de pele aprovados pelo U.S. Food and Drug Administration.

<b>Produto e Fabricante</b>	<b>Material do scaffold</b>	<b>Indicações do FDA</b>	<b>Vantagens competitivas</b>
AlloDerm® LifeCell corporation, USA	Derme humana acelular liofilizada	Queimaduras e feridas profundas	Não foi rejeitada; suporta até 2 anos de prateleira
Apligraf® Organogenesis Inc, USA	Colágeno bovino	Úlceras diabéticas e venosas	Mimetiza a função da derme; produto criopreservado
Dermagraft® Advanced BioHealing, USA	Polylactic acid/Polyglycolic acid, Matriz extracelular	Úlceras do pé diabético; úlceras secundárias à epidermólise bolhosa	Imita função da derme; produto criopreservado
Epicel® Genzyme Biosurgery, USA	auto-enxerto epidérmico conectado a um suporte de gase petrolatum	Queimaduras de espessura parcial profunda e de espessura total	Células autólogas; nenhuma rejeição; alta incidência de deposição permanente
Integra® Integra NeuroSciences, USA	Polissiloxano, colágeno de tendão bovino	Queimaduras de espessura parcial profunda e de espessura total	Dupla camada; boa função de barreira; utilizado em > 10.000 pacientes; vida de prateleira moderada
OrCel® Ortec International, USA	Espunja de colágeno bovino	Áreas doadoras de espessura parcial; epidermólise bolhosa	Imita expressão de citocinas de cicatrização da pele; 9 meses de validade; criopreservados

TransCyte® Advanced BioHealing, USA	Filme de silicone, Mesh de nylon, colágeno de porco	Queimaduras de espessura parcial profunda e de espessura total	1.5 anos de vida de prateleira; congelada
--	--	---	---

Fonte: Adaptado de PRIYA et al., 2008.

O desenvolvimento de pele artificial visa estabelecer progressivamente um substituto totalmente funcional que mimetize a pele não só pela sua estrutura, mas que possa ser capaz de assegurar também a sua revascularização e reinervação. A substituição da pele tem sido uma tarefa desafiadora para os cirurgiões, desde a introdução de enxertos de pele por Reverdin em 1871 (PRIYA et al., 2008). As primeiras terapias à base de tecido foram desenvolvidas utilizando técnicas de enxerto de pele. O primeiro substituto de pele sintético foi desenvolvido em 1962; no entanto, o primeiro sucesso da engenharia de tecidos de produtos de pele aconteceu no final de 1970 e início de 1980 (BURKE et al., 1981; LEVIN et al., 1979). Curiosamente, este produto que era uma matriz para regeneração da derme (Integra®) foi à venda apenas em 1996 (GENTZKOW et al., 1996). Em 1998, um dispositivo médico contendo células alogênicas (Apligraf®) foi aprovado pela US Food and a Drug Administration (FDA) como um substituto da pele para ser utilizado no tratamento de úlceras venosas da perna (ZAULYANOV, 2007).

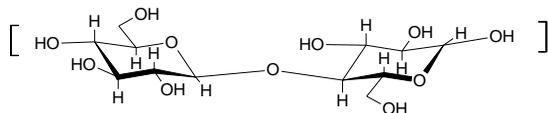
Ainda existem várias limitações na criação de substitutos de pele. Embora seja difícil de recriar a pele humana totalmente, se a biologia celular, biologia molecular, engenharia genética, ciência dos materiais e clínica reunirem os seus esforços para desenvolver técnicas otimizadas, será possível alcançar o sucesso da produção um substituto de pele ideal, em um futuro próximo.

#### 2.4 NANOCELULOSE BACTERIANA COMO BIOMATERIAL ADJUVANTE DA CICATRIZAÇÃO

Vários biopolímeros têm sido investigados para aplicações como *scaffolds*, entre os quais se destaca a celulose (SVENSSON et al., 2005). A celulose é bem conhecida como um dos materiais biodegradáveis mais abundantes na natureza e tem sido tema de amplas investigações em química de macromoléculas (CHANG E ZHANG, 2011). A celulose é um homopolímero estrutural linear de glicose

$(C_6H_{10}O_5)_n$  (Figura 4), sendo normalmente encontrada com  $n$  variando de 500 a 5000 (MULLER *et al.*, 2006). É insolúvel em água e é degradada somente por enzimas específicas (MARTSON *et al.*, 1998).

Figura 4: Estrutura química da celulose.



Fonte: elaborado pelo autor

A nanocelulose bacteriana é uma celulose natural promissora que possui uma estrutura nanofibrosa biossintetizada por certas bactérias, incluindo a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* (KONDO *et al.*, 2001). Esta bactéria produz uma película de celulose (Figura 5) entre o meio de cultura e a superfície em contato com o ar, a qual apresenta uma camada densa de um lado e uma camada gelatinosa (e porosa) do lado oposto (HELENIUS *et al.*, 2006). Além de seu uso frequente em aplicações médicas como curativos, pele artificial e vasos sanguíneos artificiais, a BNC está atualmente expandindo a sua utilização como biomaterial que possui uma *nano-network* 3D para a preparação de *scaffolds* no campo da engenharia de tecidos (FONTANA *et al.*, 1990; MORESCHI *et al.*, 2000).

Figura 5: Membrana de BNC hidratada.



Fonte: SOUZA, 2017 (tese de doutorado)

Segundo Naderi *et al.* (2011), a BNC produzida através do cultivo da bactéria, é considerada um material de baixo custo de produção e estável. O seu desenvolvimento e engenharia para aplicação translacional permite a obtenção de produtos de alto valor agregado e com amplo potencial de mercado. Em condições fisiológicas ótimas,

este biomaterial possui propriedades compatíveis com os tecidos e química de superfície das células.

De acordo com estudos anteriores, a BNC tem um grande potencial para ser utilizada como substrato na engenharia de tecidos devido às suas propriedades físico-químicas, incluindo elevada capacidade de retenção de água (hidrofilicidade), alta cristalinidade, elevada resistência à tração, biocompatibilidade e conformabilidade da rede de nanofibras, as quais diferem significativamente da estrutura da celulose vegetal (WATANABE E KONDO, 2012). Esta estrutura nanofibrilar tem provado ser uma matriz viável para melhorar a reparação dos tecidos e tem sido também utilizada em uma ampla gama de aplicações como *scaffold* para o tratamento de queimadura de segundo ou terceiro grau, para confecção de micro vasos artificiais e para engenharia de tecidos de cartilagem (HELENIUS *et al.*, 2006). Levando em consideração a perfeita aplicabilidade e adequabilidade das membranas de BNC na área do tratamento de feridas, algumas das propriedades físicas e mecânicas que a caracterizam como um material ideal para a reparação de tecidos estão listados na tabela abaixo (Tabela 3):

Tabela 3: Propriedades das membranas de BNC e a sua correlação com as funções ideais de um biomaterial usado para a reparação de tecidos

<b>Função ideal de um biomaterial usado na reparação de tecidos</b>	<b>Propriedades da BNC</b>
Manter um ambiente úmido no leito da ferida	Alta capacidade de retenção de água; elevada taxa de transmissão de vapor de água
Fornecer barreira física contra infecção bacteriana	Estrutura porosa que não permite penetração de bactéria externa no leito da ferida
Absorver exsudato	A membrana parcialmente desidratada é capaz de absorver o líquido até a sua capacidade original
Estétil, fácil de usar e de baixo custo	Membranas são fáceis de esterilizar; O custo estimado da produção de 1 cm <sup>2</sup> é \$ 0,02
Fornecer uma cobertura adequada da ferida, permitindo também uma remoção fácil e indolor	Alta elasticidade e moldabilidade

Permitir troca de gases e fluidos	Material altamente poroso com dimensões de poros que variam entre nanômetros e micrômetros
Atóxico, não-pirogênico e biocompatível	Biocompatível, não pirogênica, não-tóxica
Fornecer cobertura com alta moldabilidade e elasticidade	Alta elasticidade e moldabilidade
Fornecer estabilidade mecânica	Elevada resistência mecânica

Fonte: adaptado de CZAJA *et al.*, 2006

As aplicações tópicas da BNC são eficazes devido à sua permeabilidade, a qual aumenta capacidade de retenção de vapor d'água. Além disso, ela molda-se muito bem à superfície da pele, proporcionando uma cobertura eficiente das feridas mesmo em locais normalmente difíceis de tratar, tais como áreas na face e articulações (Figura 6).

Figura 6: Aplicação de membranas de BNC para tratamento de queimaduras.



Fonte: Adaptado de FU *et al.*, 2013.

Os primeiros esforços para comercializar a BNC em larga escala foram iniciados pela Johnson & Johnson no início de 1980. Esta empresa foi pioneira em investigações exploratórias sobre a aplicação médica de BNC no tratamento de diferentes tipos de feridas, mas a comercialização não foi lançada naquela época (CZAJA *et al.*, 2006). No Brasil, a BNC foi testada com sucesso e utilizado como tratamento para feridas, especialmente em casos de queimaduras a partir de 1988 (PEIXOTO E SANTOS, 1988). Estudos daquela época demonstraram que as queimaduras tratadas com revestimentos de nanocelulose bacteriana cicatrizavam mais rápido do que os tratamentos tradicionais

(PITANGUY et al., 1988). O uso desta técnica foi tão bem sucedido que os produtos comerciais de celulose microbiana despertaram interesse de diversas empresas. A tabela 4 descreve algumas das membranas comercialmente disponíveis:

Tabela 4: Membranas de BNC disponíveis no mercado para reparo de tecidos.

<b>Produto</b>	<b>Aplicações</b>	<b>Fabricante/País</b>
Biofill®	Substituto temporário da pele; queimaduras, úlceras de pele, cobertura de incisões cirúrgicas, lesões traumáticas e abrasões	BioFill Produtos Biotecnológicos, Brazil
XCell®	Úlceras crônicas e venosas	Xylos corporation, USA
Gengiflex®	Tratamento de doenças periodontais	USA
Bioprocess®	Úlcera venosa de perna	BioFill Produtos Biotecnológicos, Brazil
Dermafill®	Úlceras crônicas e queimaduras	Cellulose Solutions, USA
Bionext®	Substituto temporário da pele; queimaduras, úlceras de pele, úlceras diabéticas.	Bionext Biological Products, Brazil

Fonte: Adaptado de FU et al.,2012.

Houve diversas publicações e relatos sobre o uso bem-sucedido da BNC no campo clínico. Em 1990, Fontana et al. relataram pela primeira vez a aplicação de películas de nanocelulose de espessura variável, como substitutos de pele temporários. O produto, chamado Biofill, ainda tem sido utilizado atualmente em vários tratamentos de lesões da pele. Tendo em vista o sucesso da aplicação destes hidrogéis para a reparação de tecidos, a BNC configura-se em um biomaterial promissor a ser utilizado em investigações para o desenvolvimento de curativos para aplicação tópica.

## 2.5 MODIFICAÇÃO DA NANOCELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES NA ENGENHARIA DE TECIDOS

A BNC não modificada apresenta propriedades físicas e mecânicas únicas. No entanto, estudos publicados recentemente revelam que há uma grande tendência em investigações para modificar a estrutura dos scaffolds de BNC para aumentar a sua biocompatibilidade (STUMPF, 2018). A BNC modificada pode funcionar como suporte para a regeneração de uma variedade de tecidos, o que eventualmente, a torna um biomaterial interessante para o desenvolvimento de dispositivos médicos e produtos de consumo. Tais modificações podem ocorrer através da incorporação de polímeros, nanopartículas, grupos funcionais e/ou moléculas bioativas, colágeno, gelatina, alginato, poli-etileno-glicol (PEG), *Aloe vera*, entre outros (SAIBUATONG E PHISALAPHONG, 2010).

Em geral, existem duas estratégias para modificar a estrutura da BNC: métodos *in situ* e *ex situ* (Figura 7). Na modificação *in situ* a BNC é modificada durante a sua formação, variando as condições de cultura da bactéria, adicionando compostos, aditivos, ou alterando a fonte de carbono do meio de cultura. Em contraste, no método *ex situ* a modificação da BNC é realizada depois que ela foi formada, através de métodos químicos ou físicos.

Figura 7: Representação esquemática de métodos de modificação da BNC. (A) modificação *in situ* da BNC, na qual a composição do meio de cultura é alterado, geralmente com a adição de outros materiais. B) Modificação *ex situ*, em que a BNC é modificada por tratamento químico ou por adsorção de outros compostos após a membrana ter sido formada.



Fonte: adaptado de STUMPF et al., 2018

Em um estudo *in vitro*, Kim e colaboradores (2010) avaliaram a biocompatibilidade de scaffolds de BNC e BNC/PEG (polietilenoglicol) utilizando fibroblastos murinos em testes de adesão celular. Os autores observaram que os scaffolds de BNC/PEG apresentaram uma maior adesão e proliferação celular comparado à BNC pura.

Périte e colaboradores (2010) desenvolveram membranas de BNC modificadas por plasma de nitrogênio. Tal modificação resultou em incorporação química dos grupos de nitrogênio e aumento da porosidade. Fibroblastos, neuroblastos e células endoteliais cultivados sobre estas membranas demonstraram um aumento da afinidade celular quando comparados ao controle.

Wei et al. (2011), incorporaram cloreto de benzalcônio na BNC objetivando criar um sistema de liberação controlada para ser aplicado futuramente no tratamento de feridas agudas contaminadas. Após testes antimicrobianos, foi possível observar que a BNC modificada foi capaz de reduzir o crescimento de bactérias gram positivas demonstrando o potencial material produzido.

Zimmermann e colaboradores (2011) investigaram membranas BNC funcionalizadas com hidroxiapatita para aplicações na regeneração

de tecido ósseo. Os scaffolds foram implantados em animais *in vivo* e revelaram um aumento na aderência e confluência de células osteoprogenitoras na superfície do osso, demonstrando o potencial para tal aplicação.

Em 2012, Pertile et al. demonstraram que scaffolds de BNC modificados por proteínas recombinantes IKVAV-CBM3 permitiram e melhoraram significativamente a adesão, crescimento e proliferação de linhagens de células mesenquimais e neuronais.

Stumpf e colaboradores (2013) investigaram a adição de glicose ou dextrina em um meio à base de manitol para fermentação da BNC (BNC-GI e BNC-De, respectivamente) em condições de cultura estática. Ambos os meios enriquecidos diminuíram a área de superfície, a capacidade de retenção de água e a taxa de reidratação. As micrografias das membranas mostraram efeitos na densidade e porosidade das fibras em ambos os lados das membranas de BNC.

Lin et al. (2013) desenvolveram membranas de BNC e Chitosana (CH) para o recobrimento de feridas. Após caracterização físico-química, testes *in vitro* de biocompatibilidade e também testes de ação antimicrobiana, foi possível concluir que o material permitiu a adesão e proliferação de fibroblastos L929 e, adição de chitosana reduziu significativamente a contaminação por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Godinho e colaboradores (2015) desenvolveram compósitos BNC-Aloe através da incorporação de porções de *Aloe vera* no meio de crescimento da bactéria *Komagataeibacter hansenii*. As interações químicas, morfologia, cristalinidade e propriedades mecânicas da BNC foram afetadas pela suplementação de *Aloe vera*. Estudos de biocompatibilidade *in vitro* demonstraram que o compósito não foi tóxico para células de fibroblastos L929. Os resultados indicaram que este biomaterial pode ser usado para várias aplicações biomédicas, como um *scaffold* para substituição e regeneração da pele.

Ávila e colaboradores (2015) desenvolveram um *scaffold* em bicamada composto de uma camada densa de BNC e alginato para uso como cartilagem auricular. Os scaffolds em bicamada ofereceram estabilidade mecânica e mantiveram boa integridade estrutural, fornecendo uma arquitetura porosa favorável para o crescimento celular.

Keskin et al. (2017) desenvolveram um nanocompósito produzido por incorporação de queratina (isolada do cabelo humano) na BNC para melhorar adesão de fibroblastos dérmicos. Experimentos *in vitro* realizados com queratinócitos de pele humana e fibroblastos

indicaram o potencial do novo nanocomposito de BNC/queratina para ser usado na engenharia de tecidos da pele.

A incorporação de biopolímeros, tais como a poli-L-lisina, também tem sido uma estratégia adotada por pesquisadores para funcionalizar a superfície da BNC e aumentar a interação com as células. Estudos anteriores demonstraram que o hidrogel de nanocelulose bacteriana modificado com poli-L-lisina/laminina promoveu a regeneração de tecidos neurais, potencializando a adesão celular e aumentando a sobrevivência neuronal (SOUZA, 2011). Fürsatz et al. (2017) propuseram a funcionalização da BNC com  $\epsilon$ -Poly-L-Lysine ( $\epsilon$ -PLL), um biopolímero não tóxico com atividade antimicrobiana de amplo espectro. A incorporação de  $\epsilon$ -PLL na BNC inibiu o crescimento de *S. epidermidis* nas membranas, mas não afetou a citocompatibilidade dos fibroblastos humanos cultivados em comparação com a BNC pura. A funcionalização não teve efeitos significativos na estrutura nanofibrosa e nas propriedades mecânicas da BNC. A possibilidade de funcionalizar a BNC com PLL é uma abordagem promissora, verde e versátil para melhorar o desempenho da BNC em cuidados com feridas e outras aplicações biomédicas.

Culebras e colaboradores (2015) investigaram os efeitos da incorporação da poli-L-lisina e do colágeno às nanofibras de nanocelulose bacteriana. A adesão e a viabilidade de células de ovário de hamster chinês (CHO) nos substratos poli-L-lisina-BC e colágeno-BC foram analisados. Os resultados mostraram que a viabilidade celular em substrato de BC modificado com poli-L-lisina é semelhante à observada em placas de cultura de tecido de poliestireno.

Gao e colaboradores (2011) relataram em seu trabalho resultados sobre o desenvolvimento de nanofibras BNC revestidas com polilisina como substrato para deposição de hidroxiapatita (HA). Foi possível observar uma deposição de HA similar à deposição em osso quando imersos em fluido corporal simulado, confirmando a possibilidade de uso deste scaffold para aplicações em regeneração óssea.

Bazrafshan e Jebali (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana e a toxicidade de membranas de nanocelulose conjugadas com polilisina (NCPL) e poliarginina (NCPA). A toxicidade dos compostos em células da pele de camundongos e células esofágicas de rato foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os resultados demonstraram que a NCPL apresentou maior atividade antimicrobiana em comparação à NCPA. O ensaio MTT demonstrou ausência de citotoxicidade dos compostos NCPL e NCPA. Os autores sugeriram que tanto o NCPL como o NCPA são bons

candidatos a serem utilizados dentro de produtos alimentares, na embalagem de alimentos e nos materiais têxteis.

Os diversos estudos de modificação da BNC provaram que os compostos foram adicionados com sucesso através de modificações *in situ* e *ex situ* por métodos de impregnação, carga ou revestimento. Uma variedade de modificações biossintéticas ou químicas de superfície podem melhorar a funcionalidade da BNC e expandir seus potenciais campos de aplicação.

---

## 2.6 TESTES CLÍNICOS

Um novo produto só é levado à experimentação em seres humanos depois de conhecido seus aspectos químicos, farmacológicos, mecanismos de ação e toxicidade em provas pré-clínicas, *in vitro* ou em modelos experimentais (BRASIL, Ministério Da Saúde, 1997).

Teste clínico é qualquer investigação em seres humanos, objetivando descobrir ou verificar os efeitos farmacodinâmicos, farmacológicos, clínicos e/ou outros efeitos de produto(s) e/ou identificar reações adversas ao produto(s) em investigação, com o objetivo de averiguar sua segurança e/ou eficácia (EMEA, 1997). De acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, toda substância para uso médico deve ter uma indicação específica, em função de seu efeito biológico desejado para o qual se elabora um ensaio clínico. O desenho do protocolo e documentação clínica dos estudos devem seguir as recomendações dos órgãos normativos (CONSORT - consolidated standard of randomized trials) e de vigilância de medicamentos do país, para que os resultados possam ser considerados válidos para aprovação do produto.

Os protocolos dos ensaios clínicos devem ser revisados e aprovados por um Comitê de Ética Institucional que tem por objetivo avaliar a justificativa científica para a realização do estudo, a qualificação dos investigadores, a adequação dos protocolos e documentação, os critérios de recrutamento e segurança dos participantes. Os princípios éticos estão indicados na Declaração de Helsinki, adotada originalmente em 1964, por ocasião da 18<sup>a</sup> Assembléia Médica Mundial, e posteriormente atualizada. No nosso país, todos os estudos clínicos envolvendo seres humanos devem atender às normas da Resolução CNS N<sup>o</sup> 466, de 12 de Dezembro de 2012, que diz respeito à ética em pesquisa.

Os ensaios clínicos são classificados em quatro fases segundo seu nível de complexidade, estágio de desenvolvimento do produto a ser testado e objetivo da avaliação:

**Fase I.** Primeira etapa de avaliação de um produto químico/biológico em seres humanos saudáveis. Os ensaios de Fase I são geralmente precedidos de provas em modelos experimentais em animais para avaliar toxicidade e segurança de aplicação.

**Fase II.** São ensaios clínicos pilotos limitado à um pequeno número de participantes ou pacientes com o objetivo de demonstrar atividade terapêutica ou atividade imunogênica.

**Fase III.** Envolvem um grande número de participantes, eventualmente em estudos multicêntricos, quando se inclui vários grupos de pacientes tratados em serviços distintos - sempre utilizando o mesmo protocolo de investigação. O objetivo principal é demonstrar eficácia e inocuidade a curto e longo prazo.

**Fase IV.** Ensaios clínicos realizados após aprovação, registro e comercialização do produto farmacêutico. Estes estudos se destinam principalmente a avaliar a ocorrência de efeitos adversos raros ou desconhecidos.

### 3. DESENVOLVIMENTO DE *SCAFFOLD* DE NANOCELULOSE BACTERIANA MODIFICADO COM POLI-L-LISINA-COLESTEROL

#### 3.1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

A perda da integridade de grandes porções de pele devido a lesões ou doenças pode resultar em incapacidade significativa ou até mesmo a morte (PRIYA et al., 2008). A maioria das feridas de pele podem curar naturalmente, mas ferimentos extensos e irreversíveis necessitam de cobertura utilizando substitutos de pele para ajudar na reparação e regeneração. Com o aumento de pacientes com a cicatrização de feridas disfuncional, há uma necessidade urgente do desenvolvimento de novas estratégias para a reparação de tecido epitelial. Nessa perspectiva, engenharia de tecidos (ET) oferece um grande potencial, e os esforços sinérgicos de engenheiros biomédicos, cientistas de materiais e biólogos podem render terapias promissoras para feridas que não cicatrizam.

A ET tornou-se uma abordagem com particular relevância no tratamento de feridas, pois é considerada uma tecnologia biomédica promissora que visa a reparação e a regeneração dos tecidos danificados (LANGER E VACANTI, 1993). Nesse contexto, a nanocelulose bacteriana vem sendo utilizada na pesquisa como material de suporte para o crescimento celular (*scaffold*) e regeneração de vários tecidos, e possui potencial para se tornar uma excelente plataforma tecnológica para medicina (CZAJA et al., 2006).

A BNC emergiu como um biomaterial promissor para aplicações na engenharia de tecidos devido à sua excelente biocompatibilidade e propriedades físico-químicas (LI et al, 2015). Recentemente, as modificações in situ e ex situ tornaram-se o foco de muitos estudos pois estas podem aprimorar ainda mais as propriedades da BNC para atender requisitos biológicos e celulares específicos (STUMPF et al, 2016). A BNC modificada pode funcionar como suporte para a regeneração de uma variedade de tecidos distintos, o que eventualmente, a tornaria um biomaterial interessante para o desenvolvimento de dispositivos biomédicos.

Visando o desenvolvimento de um scaffold para aplicação tópica competente e funcional, o presente trabalho propõe a modificação de superfície da nanocelulose bacteriana, através da adsorção do polímero

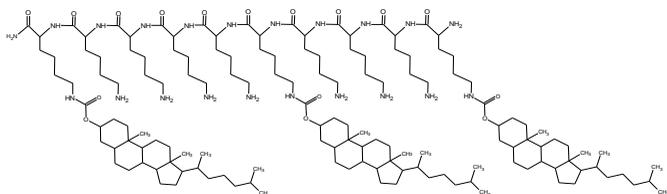
Poli-L-Lisina-Colesterol como uma alternativa eficiente para aprimorar a interação com as células epiteliais, através do uso de dois tipos de interações intermoleculares distintas.

A Poli-L-Lisina (PLL) é um homopolímero contendo aproximadamente 30 subunidades L-lisina, ligados entre os grupos carboxil e amino (HIRAKI et al., 2003). Este homopolímero melhora a adesão, proliferação e diferenciação celular através da atuação de força eletrostática entre cargas positivas da PLL e a membrana celular carregada negativamente (LEI et al, 2012). Estudos anteriores demonstraram que o hidrogel de nanocelulose bacteriana modificado com poli-L-lisina/laminina promoveu a regeneração de tecidos neurais, potencializando a adesão celular e aumentando a sobrevida neuronal (SOUZA, 2011).

Por outro lado, o colesterol é uma molécula hidrofóbica presente em diversas regiões do organismo, inclusive na membrana celular, onde regula a fluidez desta. Através da ligação de grupos colesteril em polímeros, pesquisadores têm modificado a hidrofobicidade de blocos de copolímero para uso em sistemas de entrega de fármacos (KIM et al, 2014).

A Poli-L-Lisina-Colesterol (PLC) é um homopolímero inédito na literatura, sintetizado e gentilmente fornecido pelo pesquisador Dr. Hyun-Jin Kim (Universidade de Tokyo, Japão). O design racional do polímero visa a utilização de duas interações químicas distintas (interação eletrostática e interação hidrofóbica) para facilitar a adesão de células na superfície de BNC: a PLL atua na interação eletrostática entre o biomaterial e a membrana das células, enquanto o colesterol funcionaria como âncora hidrofóbica penetrando na membrana das células. Para tanto a cadeia de PLL foi parcialmente modificada através da adição de colesterol em parte das aminas primárias (Figura 8).

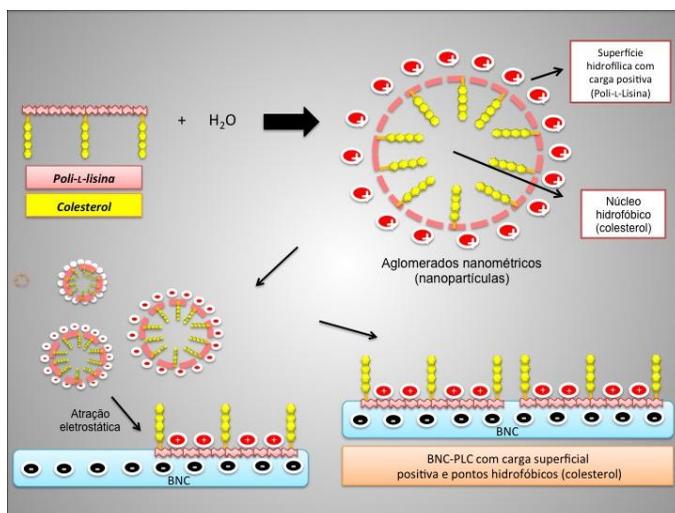
Figura 8: Estrutura química da Poli-L-Lisina-Colesterol (PLC); inserção de 30% de colesterol.



Fonte: elaborado pelo autor

Devido à característica aniônica da BNC (SHAO et al., 2017), acredita-se que a incorporação de PLC possa ocorrer através da interação eletrostática dos polícatíons da poli-L-lisina com a superfície negativamente carregada da BNC. Tal incorporação permitirá que ocorra atração eletrostática entre a membrana celular e a PLL, e que a extremidade do colesterol permaneça livre para interação hidrofóbica do colesterol com a bicamada lipídica das células, favorecendo assim uma rápida e maior adesão celular, seguida de proliferação aumentada. Uma figura esquemática representativa da hipótese deste estudo pode ser observada abaixo (Figura 9):

Figura 9: Representação esquemática da hipótese descrita para a modificação da superfície da BNC através da adsorção de Poli-L-Lisina-Colesterol.



Fonte: elaborado pelo autor

Além da modificação de superfície, será proposto um modelo de cocultura de queratinócitos e fibroblastos, visando a construção de um dispositivo que se assemelhe à estrutura original da pele. Em hipótese, as células epiteliais em cocultura seriam capazes de reconhecer a matriz de BNC modificada como um ambiente propício para a adesão, proliferação, e expressão de colágeno e integrinas, genes chave adjuvantes no processo de cicatrização.

## 3.2 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 3.2.1 *Produção e purificação de membranas de nanocelulose bacteriana*

As membranas de nanocelulose bacteriana foram produzidas utilizando inóculo da bactéria *G. hansenii* ATCC 23769, obtida da "Coleção da Cultura Tropical (CCT)", da Fundação André Tosello, Campinas – SP. O inóculo foi produzido três dias antes do início dos experimentos a partir do cultivo da bactéria em meio manitol sólido, e mantido a 26°C em estufa bacteriológica até a obtenção de colônias isoladas. O inóculo de trabalho foi produzido a partir da suspensão de colônias isoladas ( $D.O_{660} = 0,150$ ) e posteriormente adicionado ao meio de cultura na proporção de 10% (v/v) para a produção das membranas. O meio utilizado para o cultivo da bactéria e produção das membranas foi composto de 25 g de manitol, 5g de extrato de levedura e 3 g de peptona diluídos em 1 L de água destilada. O pH foi ajustado para 6,6 e posteriormente o meio foi encaminhado para autoclavagem (20 minutos a 121°C). As membranas foram produzidas em placas de cultura de 24 poços, aonde foram adicionados 1000µL por poço da solução de inóculo e meio de cultura. As placas de cultura foram mantidas em cultura estática à temperatura de 26°C por um período de 7 dias. Após o sétimo dia, as membranas de BNC que cresceram na interface líquido/ar de cada poço de cultura foram removidas para dar início ao processo de purificação, utilizando-se uma solução de NaOH 0,1 mol/L a 50°C por 24 horas, seguido de lavagens sucessivas com água destilada até o pH atingir a neutralidade (pH 7,0). Após este processo, as membranas foram esterilizadas em autoclave e mantidas sob refrigeração até serem utilizadas para os ensaios.

### 3.2.2 *Preparação de membranas de nanocelulose bacteriana com superfície modificada através da adsorção de poli- L-lisina-colesterol (BNC-PLC)*

#### 3.2.2.1 Caracterização da Poli-L-Lisina-Colesterol

##### 3.2.2.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

A caracterização estrutural da poli-l-lisina-colesterol foi realizada utilizando-se a técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de  $^1H$ ) a 25°C, solubilizando-se aproximadamente 2 mg de amostra em metanol deuterado ( $CD_3OD$ ), em tubo de 5 mm de diâmetro. Os espectros foram obtidos em espectrômetro VARIAN 400-MR (Laboratório Multiusuário de Análises por RMN - LAMAR, Instituto de

Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro) e processados no software MestReNova. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são referidos em partes por milhão (ppm) a partir do padrão interno tetrametil-silano (TMS). As áreas dos picos foram obtidas por integração eletrônica.

#### 3.2.2.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Considerando a PLC um polímero recém-sintetizado, ainda inédito na literatura, não há descrição de seu comportamento em meio aquoso. Para verificar se o polímero forma nanopartículas, foi utilizada a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), o qual irá determinar o tamanho das partículas presentes na suspensão, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (Embrapa, Juiz de Fora-MG).

#### 3.2.2.1.3 Mobilidade eletroforética (potencial zeta)

A carga superficial da PLC em meio aquoso foi avaliada a partir da medida da mobilidade eletroforética por anemometria de laser Doppler num campo elétrico de 150 V/cm. A carga de superfície da PLC foi estimada por medidas de potencial zeta, no qual as partículas se movem na presença do campo elétrico em direção ao eletrodo de carga oposta e, desta forma, o potencial elétrico pode ser determinado pela medida da sua velocidade de migração. Para determinação do potencial zeta a suspensão polimérica (5 mg/ml) foi colocada em uma cubeta e as medidas foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments (Embrapa, Juiz de Fora-MG).

#### 3.2.2.2 *Modificação da superfície da membrana de nanocelulose bacteriana*

##### 3.2.2.2.1 Adsorção de Poli-L -Lisina-Colesterol

Para a obtenção dos hidrogéis de BNC com poli-L-lisina-colesterol adsorvidos em sua superfície (BNC-PLC), foi utilizado o método descrito por Sousa (2011) com algumas modificações. Para tanto, 100  $\mu$ L de uma solução filtrada de PLC (1 mg/ml diluído em água) foram instilados sobre a superfície do hidrogel de BNC, o qual foi mantido em temperatura ambiente por 24 h. Logo após, os hidrogéis foram lavados com água destilada estéril para remoção dos polímeros não adsorvidos e mantidos sob refrigeração até serem utilizados para os ensaios.

### 3.2.2.3 Caracterização das membranas de nanocelulose com superfície modificada

#### 3.2.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

A presença de grupos funcionais nas membranas de nanocelulose bacteriana foi analisada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Este ensaio teve como intuito identificar os grupos funcionais presentes nas membranas com superfície modificada pela PLC.

As análises espectroscópicas foram realizadas em espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier, Thermo Scientific, modelo Nicolet iS10 (Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas - LASSBio, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro), equipado com o acessório de refletância total atenuada (SMART iTR), usando um cristal de diamante. As medições foram obtidas diretamente com o acessório SMART iTR coberto por uma fina camada das amostras. Os espectros foram coletados entre 3800 e 800  $\text{cm}^{-1}$ , com 16 varreduras e resolução de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ , e processados no software do próprio equipamento, sendo expressos no modo transmitância. O background foi registrado antes da aquisição de cada um dos espectros e um teste negativo foi realizado entre cada medida para verificar se o cristal estava devidamente limpo.

#### 3.2.2.3.2 Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de AFM foram obtidas via modo intermitente em aparelho Nanosurf easyScan 2, Nanosurf Instruments (Embrapa, Juiz de Fora-MG), em ar. As amplitudes de oscilação livres do cantilever foram tipicamente 60 mV e o tamanho de varredura da sonda do microscópio foi de 5x5  $\mu\text{m}$ . A resolução do AFM foi de 512x512 pixels. O comprimento e o raio da ponta foram de 225  $\mu\text{m}$  e <10 nm, respectivamente. A imagem foi realizada diretamente sobre a membrana liofilizada.

### 3.2.3 Análise da biocompatibilidade *in vitro* da membrana de nanocelulose bacteriana com superfície modificada

#### 3.2.3.1 Preparação das amostras para os ensaios *in vitro*

Os grupos experimentais foram divididos entre membranas puras (BNC) ou com superfície modificada (BNC-PLC). Anteriormente aos ensaios *in vitro*, as membranas foram colocadas em placas de 24 poços e 1mL de meio de cultura celular Dulbecco's modified Eagles's Medium (DMEM) (Gibco®) sem suplementação foi adicionado em cada poço. As membranas permaneceram em atmosfera úmida, a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 24 horas (Figura 10). Logo após, o meio de cultura foi completamente removido no momento anterior à semeadura de células. As células foram semeadas sobre a face mais porosa da membrana, em todos os ensaios descritos a seguir.

Figura 10: Membrana de Nanocelulose hidratada em meio DMEM.



Fonte: Elaborado pelo autor

#### 3.2.3.2 Citotoxicidade direta

O potencial citotóxico da membrana BNC-PLC foi avaliado através do ensaio de citotoxicidade direta, conforme protocolo recomendado pela ISO 10993-5: 2009. Para tanto, a atividade metabólica de fibroblastos de tecido conectivo de camundongo, linhagem L929, foi avaliada e quantificada pelo método MTT após cultivo em contato direto com a BNC e BNC-PLC. Este teste colorimétrico estima a atividade mitocondrial produzindo cristais de formazan, os quais são quantificados por absorbância.

Os Fibroblastos L929 foram descongelados e cultivados em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium DMEM (Gibco®, EUA). O meio de cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino

(Gibco®, EUA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®, EUA) e as células em cultura foram mantidas em atmosfera úmida, à temperatura de 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, em placa de cultura de tecidos (TPP, Suíça) para a propagação celular. Após atingir a confluência de 80% de preenchimento das superfícies das placas de cultura, as mesmas foram lavadas 3 vezes com uma solução de PBS para a remoção das proteínas do soro fetal bovino (SFB). Em seguida, foi adicionada uma solução de tripsina 0,02% (Gibco®, EUA) para descolamento das células aderidas na placa de cultura. As células foram coletadas e quantificadas utilizando-se uma câmara de Neubauer (SP Labor, Brasil).

Os fibroblastos foram então semeados em placas de cultura de 24 poços, na densidade de  $2 \times 10^4$  células/poço, contendo 1 mL de meio de cultura DMEM e mantidos na estufa, em atmosfera úmida, à temperatura de 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após este período, amostras de BNC (controle) e BNC-PLC foram adicionadas sobre as células em cultura. Após o tempo de cultura de 1, 3 e 7 dias, as amostras foram removidas. As células em cultura foram lavadas com PBS (três vezes) e 300 µL de meio de cultura e 60 µL do reagente MTT foram adicionados em cada poço de cultura, para em seguida ser incubadas por 3 h em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a incubação, cada solução foi homogeneizada e 100 µL de cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços (TPP-AG®, Switzerland). A absorbância das soluções foi medida em 490 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, EUA). O efeito das amostras sobre a atividade metabólica dos fibroblastos L929 foi calculado utilizando-se a absorbância das células em contato com a BNC como controle.

### 3.2.3.3 Cultura de células epiteliais

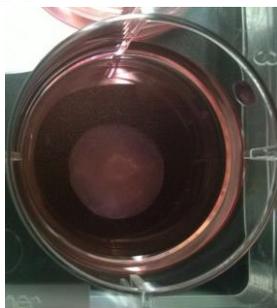
Para os ensaios *in vitro* foram utilizados Fibroblastos humanos dermais primários (HDF), gentilmente fornecidos pelo Instituto de biociências da Universidade de São Paulo, e Queratinócitos da linhagem HaCaT. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina e mantidos em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (Laboratório de cultivo celular, NIQUA, UFJF).

#### 3.2.3.3.1 Semeadura de Fibroblastos humanos dermais primários (HDF)

Os fibroblastos dermais humanos primários (HDF) foram cultivados em meio DMEM como descrito acima. Após confluência de 80 a 90% as células foram tripsinizadas e a suspensão de células quantificada utilizando-se uma câmara de Neubauer. Após a contagem, uma suspensão

contendo  $4,5 \times 10^4$  células em 20  $\mu\text{l}$  de meio DMEM foi depositada sobre as membranas de nanocelulose (BNC e BNC-PLC), dispostas em placas de 24 poços, previamente preparadas como descrito anteriormente. Após a semeadura, as amostras foram incubadas em atmosfera umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por 2 horas para aderência das células na membrana e então, 1 ml de meio DMEM foi adicionado em seguida. Tal procedimento foi adotado a fim de evitar o extravasamento da suspensão de células para o fundo da placa, fazendo com que as células permanecessem aderidas na superfície da celulose. As membranas foram mantidas em estufa por até 7 dias e o meio de cultura foi trocado a cada  $2/3$  dias conforme necessário.

Figura 11: Fibroblastos semeados em membrana de nanocelulose hidratada em meio DMEM



Fonte: Elaborado pelo autor

### 3.2.3.3.2 Cocultura de Fibroblastos humanos dermais primários (HDF) e Queratinócitos humanos (linhagem Hacat)

#### 3.2.3.3.2.1 Modelo de semeadura simultânea

No modelo de semeadura simultânea os dois tipos celulares distintos foram semeados na BNC e BNC-PLC ao mesmo tempo, respeitando a proporção 1:1 entre queratinócitos e fibroblastos. Alternativamente, foi realizada a cocultura em placa de poliestireno para verificar a adaptação dos dois tipos celulares em um mesmo ambiente. As células foram cultivadas separadamente em meio DMEM como descrito acima. Após confluência de 80 a 90% as células foram tripsinizadas e a suspensão de células quantificada utilizando-se uma câmara de Neubauer. Para a cocultura, os hidrogéis previamente preparados conforme descrito na seção anterior, foram retirados da estufa de  $\text{CO}_2$  e o meio de cultura foi removido. A suspensão de células combinadas foi semeada sobre a superfície dos hidrogéis e na placa de poliestireno considerando a mesma proporção de 1:1. A densidade celular

correspondeu aproximadamente a  $2,5 \times 10^6$  queratinócitos/mL e fibroblastos/mL e 30  $\mu$ L desta suspensão foram inoculados sobre a superfície das membranas. Logo após, as membranas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e após 1 hora, quando as células já estavam parcialmente aderidas à superfície, 1mL de meio DMEM foi adicionado em cada poço. As membranas foram mantidas em estufa por até 7 dias e o meio de cultura foi trocado a cada 2/3 dias conforme necessário.

#### 3.2.3.3.2.2 Modelo organotípico

Para o modelo organotípico, inicialmente os fibroblastos humanos dermais primários (HDF) foram semeados nas membranas de nanocelulose na densidade de  $4,5 \times 10^4$  como descrito anteriormente e mantidos em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24h. Após o período de incubação, queratinócitos na densidade de  $4,5 \times 10^4$  foram semeados sobre a monocamada de fibroblastos a fim de reproduzir um modelo organotípico similar à estrutura original da pele. Logo após, as membranas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e após 1 hora, quando as células já estavam parcialmente aderidas à superfície, 1mL de meio DMEM foi adicionado em cada poço. As membranas foram mantidas em estufa por até 7 dias e o meio de cultura foi trocado a cada 2/3 dias conforme necessário.

#### 3.2.3.4 Análise da morfologia celular

A morfologia das células cultivadas nas membranas BNC e BNC-PLC foram analisadas através de microscopia óptica utilizando-se um microscópio equipado com sistema de captura de imagens (AMScope, EUA). Para tanto os modelos de cocultura (simultânea e organotípico) e os fibroblastos HDF foram cultivados em triplicata de acordo com a metodologia descrita acima e micrografias foram registradas nos tempos de 1, 3 e 7 dias de cultivo.

#### 3.2.3.5 Análise da atividade metabólica (MTS)

O ensaio de atividade metabólica foi realizado para alcançar dois objetivos: determinar se a adsorção da Poli-L-lisina-colesterol altera a atividade metabólica das células cultivadas na BNC e BNC-PLC e determinar a eficiência dos dois modelos de cocultura desenvolvidos neste estudo.

Métodos colorimétricos podem ser utilizados para a avaliação quantitativa da atividade metabólica das células, aplicando-se corantes como o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium

Bromide) e MTS (3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio/PMS). Tais corantes são bioreduzidos pela enzima desidrogenase mitocondrial presente nas células viáveis, formando-se cristais de formazana que podem ser detectados colorimetricamente. A diferença entre o uso destes dois métodos, é que o MTT forma cristais de formazana insolúveis em meio aquoso, sendo necessário o uso de solventes orgânicos para a determinação do espectro colorimétrico, enquanto os cristais de MTS são solúveis. Portanto, considerando a vantagem da solubilidade dos cristais de formazana, o qual poderia permanecer impregnado nas membranas de nanocelulose, foi utilizado o método MTS utilizando-se o kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega).

Neste ensaio, foram analisados os seguintes grupos: i) Fibroblastos humanos dermais primários (HDF); ii) Queratinócitos linhagem HacaT; iii) modelo de cocultura simultâneo e iiii) modelo de cocultura organotípico. As células foram cultivadas como descrito anteriormente, o meio de cultura foi removido dos poços após o cultivo celular e em seguida, as membranas lavadas duas vezes com PBS. Após a lavagem, os hidrogéis foram transferidos para uma nova placa de 24 poços. Sobre cada membrana serão adicionados 300 µL de meio DMEM e 60 µL do reagente MTS. As amostras serão incubadas por 3 horas em atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Após a incubação, as amostras foram homogeneizadas e 100 µL de solução transferidos para uma nova placa de 96 poços. A absorbância foi determinada a 490 nm no leitor de microplacas Multiskan GO, Thermo Fisher (Laboratório NIQUA-UFJF). Os ensaios foram realizados em triplicata, em função do tempo de 1, 3 e 7 dias de cultura. Os fibroblastos e queratinócitos, em cocultura ou não, cultivados diretamente na membrana de BNC pura foram utilizados como controle.

### 3.2.3.6 Análise da viabilidade celular (Live and dead)

Para identificar qualitativamente a viabilidade dos fibroblastos e das células em cocultura organotípica após os 7 dias de cultivo (tempo máximo de incubação pré-determinado neste estudo) nas membranas BNC e BNC-PLC, foi realizado o ensaio de live and dead. A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o kit Live/Dead®-Viability/Citotoxicity (Invitrogen). Inicialmente foi preparada uma solução (4:1) de calceína e homodímero de etídio em PBS. Logo após, 100 µL da solução foi adicionada sobre cada membrana e estas foram incubadas por 45 minutos em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Ao final do período de incubação as membranas foram montadas em lâminas para visualização no

microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse Ci-L - CENTRALBIO/UFJF).

### 3.2.3.7 Análise da adesão celular

A capacidade de adesão dos fibroblastos humanos primários à membrana BNC-PLC foi testada através da contagem diferencial do número de células não aderidas. A membrana de nanocelulose pura (BNC) e a membrana BNC-PLC foram dispostas em placa de cultura de 6 poços em triplicata e mantidas em meio DMEM sem suplementação em atmosfera úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24h. Logo após as células em passagem P8 foram descoladas das garrafas de cultura utilizando-se uma solução de tripsina e em seguida, plaqueadas a uma densidade de  $4,5 \times 10^4$  células/membrana. As membranas foram mantidas em condições de cultivo em intervalos de 30, 60 e 120 minutos. Ao final de cada tempo, as membranas foram gentilmente lavadas com 1ml de PBS para remoção das células não aderentes, e retiradas do poço. A suspensão de células não aderentes foi homogeneizada e 10µl foram retirados para coloração com azul de tripano para posterior contagem utilizando a câmara de Neubauer em microscópio óptico. Para o cálculo do número de células aderidas foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Número de células aderidas} = N \text{ de células plaqueadas} - N \text{ de células não aderidas}$$

A capacidade de adesão dos fibroblastos foi expressa considerando a porcentagem de células aderidas ao longo do tempo. Concomitantemente à contagem, as células semeadas nas membranas foram analisadas em microscópio óptico para registro da imagem em cada intervalo de tempo correspondente.

### 3.2.3.8 Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Para determinar o perfil de expressão de genes específicos relacionados à produção de matriz extracelular (colágeno) e adesão nos fibroblastos humanos cultivados sob scaffolds de nanocelulose, foi realizada a análise por RT-PCR em tempo real. Para tanto, as células foram cultivadas nos diferentes grupos de tratamento (BNC e BNC-PLC) em triplicata, na densidade de  $1 \times 10^6$  células/membrana por um período de 24h. As células cultivadas diretamente na placa de cultivo de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) em triplicata, foram utilizadas como controle. Neste momento optou-se por analisar a expressão gênica apenas dos fibroblastos, visto que no modelo de cocultura organotípico, eles são o único tipo celular que está em contato direto com a nanocelulose.

### 3.2.3.8.1 Extração de RNA: desenvolvimento de protocolo otimizado

A extração de RNA de células cultivadas em membranas de nanocelulose é ainda um desafio nos dias atuais. Muitos pesquisadores encontram dificuldades de obtenção de um RNA puro e de qualidade, devido à contaminação com polissacarídeos e o baixo rendimento das amostras. No presente estudo foi desenvolvido um método eficaz para obtenção de RNA extraído de células cultivadas sobre a nanocelulose, com qualidade e rendimento suficientes para a análise da expressão gênica.

Considerando as semelhanças entre membranas de nanocelulose e tecidos vegetais, os quais são ricos em polissacarídeos, foi utilizado o kit RNeasy Plant Mini (Qiagen, EUA) para obtenção do RNA total extraído das células cultivadas sobre a nanocelulose bacteriana. Um passo importante deste kit é o uso da coluna QIAshredder, que consiste em um sistema único de trituração e filtração de biopolímeros. O procedimento seguiu as orientações do fornecedor com algumas modificações, como descrito a seguir.

Basicamente, após o tempo de cultivo pré-determinado, as membranas contendo as células aderidas foram lavadas com PBS, imersas em tampão de lise (450  $\mu$ L) e homogeneizadas em ultrassom (DES500, Unique) (Figura 12) por 1 min à potência de 500 watts em banho de gelo. Logo após o rompimento da membrana, o homogeneizado foi filtrado através das colunas QIAshredder (Qiagen) para cada RNA separadamente. O RNA total foi isolado utilizando as colunas de purificação do kit, conforme orientações descritas no manual do fabricante.

Figura 12: Desruptor de célula ultrassônico modelo DE500 (Unique) utilizado para rompimento mecânico da membrana de nanocelulose bacteriana celularizada.



O rendimento do RNA obtido foi determinado em espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE) através da leitura a 260nm. A pureza do RNA foi avaliada pelas razões entre os valores da absorvância em 260/280nm. Considerou-se adequadas as quantidades de RNA acima de 50 ng/ $\mu$ l com grau de pureza entre 1,7 e 2,0.

### 3.2.3.8.2 Síntese de cDNA e amplificação dos genes

A síntese de cDNA foi realizada seguindo as instruções do fabricante para o kit High Capacity complimentary DNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para a análise da expressão gênica o kit SYBR select Master Mix (Applied Biosystems) foi utilizado combinado com um primer específico para cada um dos genes examinados. A termociclagem em tempo real foi realizada nas seguintes condições: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 15 min, 40 ciclos de desnaturação (94 °C, 15 seg) e anelamento e extensão (60 °C, 1 min). Para a quantificação da expressão absoluta, foi utilizado o método da curva padrão. O gene  $\beta$ -actina foi utilizado como referência para a normalização da expressão. As amostras foram processadas em triplicata, e os primers utilizados estão listados na tabela a seguir:

Tabela 5: Primers a utilizados no estudo de expressão gênica:

Gene	Nº de acesso	Primer Forward	Primer Reverse
<i>Actb</i>	NM_0011	CCAACCGCGAGAAGATGA	CCAGAGGCGTACAGGGATAG
<i>Coll1a1</i>	NM_000088	TCAAAAACGAAGGGGAGATG	CCAAATCTGTCTCCCCAGAA
<i>Irga1</i>	NM_181501.1	TCAATGACTTTCAGCGGCC	ACCTCTCCCAACTGGACACT
<i>Irga2</i>	NM_002203.3	ACTTTGTGTGCTGGTCTCT	GGAGCCAATCTGGTCACCTC

### 3.2.3.9 Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente através do *software* Graphpad Prism 7.0 e expressos como a média e erro padrão da média, e posteriormente comparados através da análise de variância de uma via (1 way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey. Diferenças estatisticamente significantes foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

---

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Caracterização da poli-L-lisina-colesterol (PLC)

#### 3.3.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

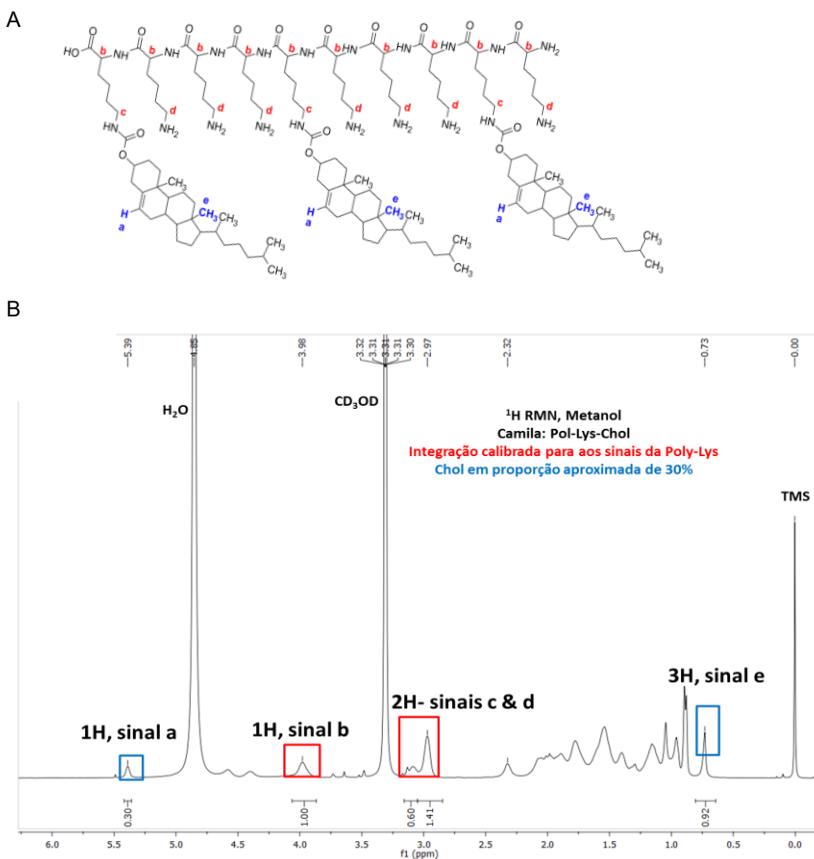
Conforme citado anteriormente, o polímero poli-L-lisina-colesterol (PLC) foi sintetizado e gentilmente doado pelo Dr. Hyun Jim Kim, pesquisador da Universidade de Tokyo/Japão. Por ser uma modificação inédita na cadeia do polímero, não há na literatura relato de sua caracterização estrutural, portanto faz-se necessária a realização da ressonância magnética nuclear. A caracterização foi realizada solubilizando-se o polímero em metanol deuterado e os picos foram atribuídos de acordo com a estrutura química da PLC.

De acordo com a figura 13, os espectros demonstram picos proeminentes em  $-5.39$ ,  $-3.98$ ,  $-2.97$  e  $-0.73$  ppm. Os prótons de identificação da cadeia de poli-l-lisina estão marcados em vermelho e indicados pelas letras b, c, d (Figura 14A). Tais prótons foram identificados através dos sinais em  $-3.98$  (proton b) e  $-2.97$  ppm (proton c, d). Os prótons de identificação da inserção da molécula de colesterol estão marcados em azul e indicados pelas letras a, e (Figura 14B). Tais prótons foram identificados através dos sinais em  $-5.39$  (proton a) e  $-0.73$  ppm (próton e).

Para calcular a porcentagem de inserção de colesterol nas cadeias de poli-lisina, foi feita a integração dos sinais. O sinal do próton b (identificador da poli-l-lisina), foi definido com o valor de 1.00 (referente à 1 hidrogênio - 1H). A partir daí, a integração do sinal de c & d (2 hidrogênios da poli-lisina) mostrou o valor somado de 2.01, indicando a acurácia da medição. O sinal a (1 hidrogênio do colesterol - 1H) e o sinal e (3 hidrogênios do colesterol - 3H), mostraram o valor de integração em relação ao sinal b com 0.30 e 0.92. Como o valor atribuído a 1H de poli-lisina foi 1.00 (próton b), e o valor obtido na integração do sinal de 1H da molécula de colesterol (próton a) foi de 0.30, a integração indica a inserção de 30% de colesterol nas cadeias de poli-l-lisina. Em

exemplo, se houvesse inserção de colesterol em 100% das aminas primárias de poli-L-lisina, a integração dos dois sinais seria próxima a 1.00.

Figura 13: A) estrutura química de PLC com marcação de prótons para identificação; B) espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de PLC em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



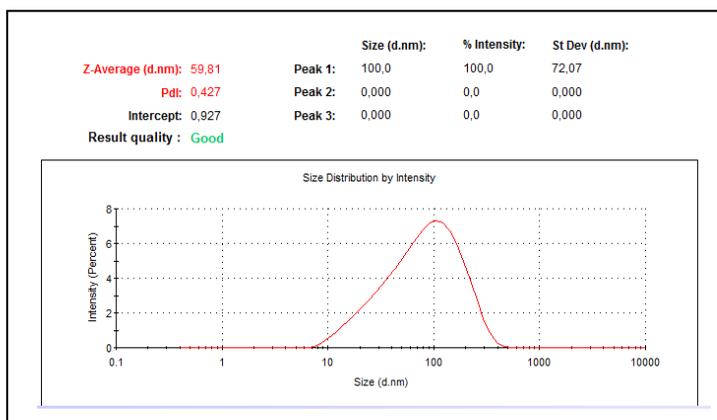
Desta forma, com a integração calibrada das áreas dos sinais atribuídos ao composto PLC, pode-se observar que a inserção do colesterol na molécula de PLL apresenta-se em torno de 30%, confirmando o sucesso da síntese do polímero conjugado.

### 3.3.1.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e mobilidade eletroforética (potencial zeta)

Para analisar o comportamento do polímero em meio aquoso, e confirmar se houve a formação de nanopartículas devido às características anfífilas do polímero, foi realizada a análise do diâmetro hidrodinâmico por DLS. Para a determinação da carga superficial das nanopartículas utilizou-se a técnica de mobilidade eletroforética. Para tanto, anteriormente às leituras o polímero foi solubilizado em H<sub>2</sub>O (1mg/ml), homogeneizado vigorosamente e filtrado.

De acordo com o gráfico de distribuição de tamanho por intensidade mostrado na Figura 14, pode-se confirmar que houve a formação de agregados nanométricos de diâmetro hidrodinâmico médio em 59 nm e índice de polidispersão de 0.427. A distribuição do diâmetro por intensidade apresentou-se unimodal, teve pico em 100 nm e confirma a formação de agregados nanométricos. A suspensão de nanopartículas apresentou carga superficial de 48 mV, ou seja, bastante positiva, sugerindo a formação de nanopartículas de acordo com a hipótese da figura 9, em que a poli-l-lisina (catiônica e hidrofílica) forma uma camada externa sobre o núcleo de colesterol (hidrofóbico).

Figura 14: Histograma de distribuição de tamanho por intensidade determinado por medidas de DLS das nanopartículas de PLC formadas em água.



### 3.3.2 Caracterização das membranas de nanocelulose com superfície modificada

O processo de modificação de superfície de filmes através da incorporação de polímeros foi baseado em técnica descrita por Souza (2011). A adsorção do polímero PLC foi realizada por interação eletrostática entre as aminas positivas de PLC com as fibras negativas da BNC.

Diferenças significativas na estrutura superficial entre as membranas BNC e BNC-PLC foram macroscopicamente observadas quando as mesmas estavam em estado liofilizado (Figura 15). A BNC apresenta naturalmente um aspecto branco opaco quando liofilizadas. Já a BNC-PLC apresentou uma perda desta opacidade, mostrando-se com aspecto transparente ou “engordurado”. Tal mudança no aspecto macroscópico da membrana, é sugestivo da deposição superficial da Poli-L-lisina-colesterol, que possui moléculas de colesterol (lipídeo) ligadas covalentemente à lisina. Tais diferenças não foram observadas quando a membrana estava hidratada.

Figura 15: Fotografia das membranas BNC e BNC-PLC. Os poços superiores mostram membranas hidratadas em meio DMEM e abaixo membranas liofilizadas (BNC à esquerda, BNC-PLC à direita)



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

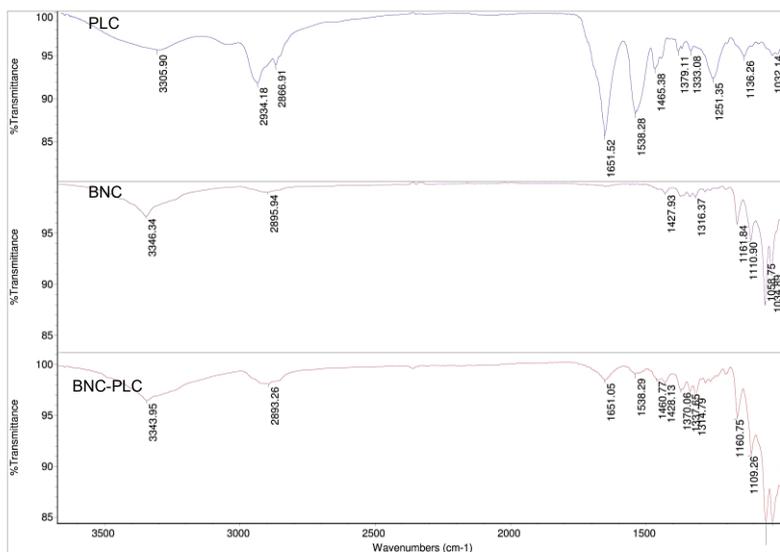
#### 3.3.2.1 Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

As membranas de BNC e BNC-PLC foram analisadas por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) combinada com refletância total atenuada (ATR) com o objetivo de caracterizar quimicamente e identificar os grupos funcionais presentes. A espectroscopia no infravermelho (IR) atribui bandas ou picos

relacionados à orientação e estrutura das moléculas presentes em materiais distintos (KACURAKOVA et al., 2002).

A região estudada para análise das membranas BNC e BNC-PLC, bem como do polímero PLC, abrangeu a janela espectral entre os picos correspondentes a 3800 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ . Como ilustrado na Figura 16, a janela espectral corresponde às bandas ou picos de grupos funcionais que caracterizam as membranas estudadas.

Figura 16: Análise por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do polímero PLC e das membranas BNC e BNC-PLC.



No espectro da BNC foram encontradas as bandas típicas em 3346  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento da ligação OH e 2895  $\text{cm}^{-1}$  de estiramento assimétrico de  $\text{CH}_2$ . A banda em 1427  $\text{cm}^{-1}$  refere-se a vibrações da ligação HCH e OCH, enquanto em 1316  $\text{cm}^{-1}$  à deformação angular simétrica fora do plano  $\text{CH}_2$ , em 1161  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento assimétrico COC, em 1110–1058  $\text{cm}^{-1}$  ao estiramento CO e CC. Tal resultado encontra-se em acordo com os trabalhos de Godinho (2014) e Sugiyama et al (1991), que fizeram atribuições exatas às mesmas bandas.

Por sua vez, no espectro de PLC foram encontradas as bandas típicas em 3305 referentes ao estiramento NH das aminas e amidas, e as bandas em 2934 e 2866  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao estiramento de metileno,

respectivamente. As bandas em 1651 e 1538  $\text{cm}^{-1}$  referem-se às amidas primárias e amidas secundárias do polipeptídeo, respectivamente. Tais bandas foram observadas por Jordan et al. (2014), na análise de poli-l-lisina.

Por outro lado, as bandas da região espectral entre 2800 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  foram observadas por (Paradkar & Irudayaraj, 2002) referentes à análise da molécula de colesterol. Esta região está correlacionada com vibrações simétricas e assimétricas dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  e é diagnóstica para a determinação do conteúdo de colesterol (PARADKAR & IRUDAYARAJ, 2002).

Finalmente, além das bandas características da celulose o espectro BNC-PLC mostra as bandas 2893 (aumentada), 1651 e 1538  $\text{cm}^{-1}$  que são característicos do polímero PLC. Este resultado confirma que o polímero PLC foi incorporado na BNC através da metodologia utilizada.

### 3.3.2.2 Microscopia de força atômica (AFM)

Para análise da topografia da superfície das membranas de nanocelulose pura e modificada, foi realizada a microscopia de força atômica (AFM). As imagens topográficas estão apresentadas na Figura 17. A topografia de BNC (Figura 17 A e B) mostrou a organização de fibras de celulose em *clusters* na face superior (de contato com o ar), que é reconhecidamente menos porosa que a face inferior (de contato com água e bactéria produtora) (STUMPF et al, 2013). Tais *clusters* tornaram a topografia de BNC com formas abruptas e margens em forte declive. Surpreendentemente, a membrana modificada BNC-PLC (Figura 17 C e D) mostrou topografia suave, em geral com aclives longos porém menos abruptos. É importante lembrar que tais características foram observadas nas membranas liofilizadas, e que o processo de liofilização pode modificar a estrutura original da membrana hidratada.

A Figura 18 mostra a ampliação de uma região da Figura 17 C, para melhor visualização das nanofibras. Como pode ser observado, a topografia suave apresentada pela BNC-PLC é composta por nanofibras de diâmetro ao redor de 100 nm, que se encontram entrelaçadas. Tal valor aproximado é correspondente ao achado de outros pesquisadores (STUMPF et al, 2013; GODINHO, 2014; GODINHO et al, 2015), utilizando técnicas distintas, como microscopia eletrônica de varredura.

Um dos objetivos desta análise foi identificar a presença ou não de agregados nanométricos (nanopartículas) depositados na superfície da nanocelulose, provenientes da adsorção do polímero PLC em solução. Não foram observados agregados em torno de 100 nm sob as fibras. Tais agregados modificariam a topografia por aumentar pontualmente a altura

da fibra, o que não foi observado em aumentos nas imagens. Mandal e Chakrabarty (2015), observaram estruturas nanométricas (circuladas em verde) e micrométricas em biofilmes compostos contendo celulose (Figura 19). Os achados desta análise mostram que não há nanopartículas aderidas às fibras de nanocelulose, sugerindo o desenovelamento do polímero sobre as fibras, tal como apresentado na hipótese ilustrada na Figura 9.

Figura 17: Imagens de microscopia de força atômica (AFM) da superfície das membranas de nanocelulose pura (BNC) e com superfície modificada (BNC-PLC). A e B) Imagem topográfica da BNC em 2D e 3D, respectivamente. C e D) Imagem topográfica da BNC-PLC em 2D e 3D, respectivamente.

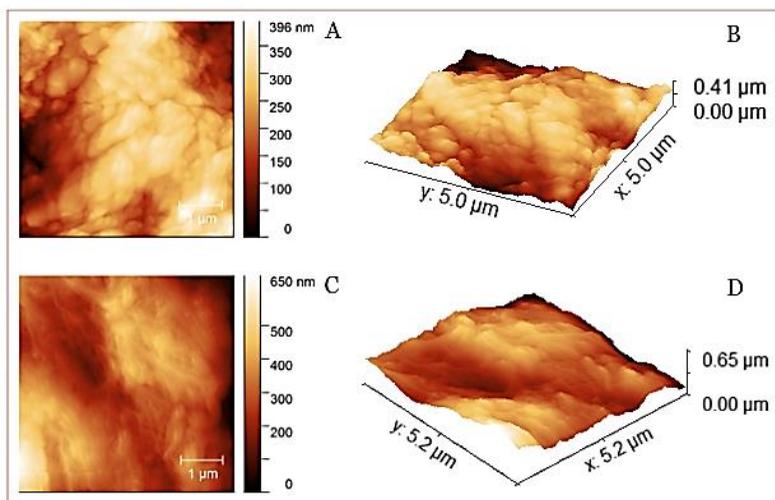


Figura 18: Imagem 2D ampliada da superfície superior da membrana de nanocelulose modificada (BNC-PLC). Barra corresponde a 1  $\mu\text{m}$ .

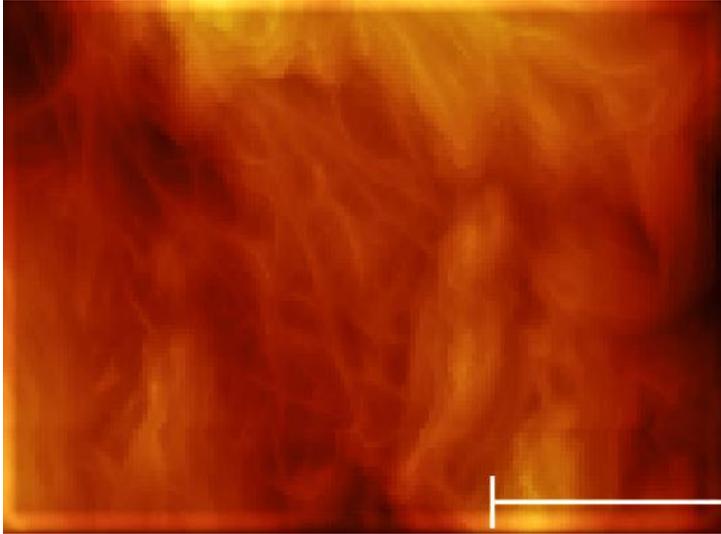
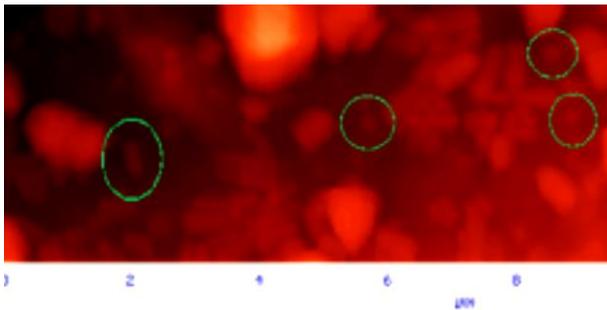


Figura 19: Imagem de AFM do trabalho de Mandal e Chakrabarty (2015) mostrando a presença de nanopartículas (círculos verdes) na superfície de biofilme de Polivinil-alcool/ poliacrilamida- nanocelulose.



Fonte: Mandal e Chakrabarty (2015)

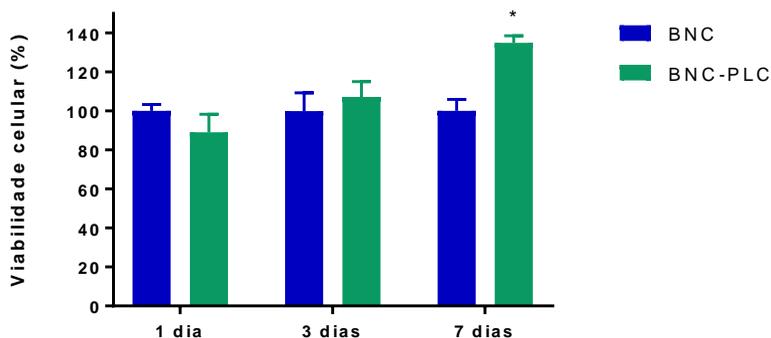
### 3.3.3 Análise da biocompatibilidade *in vitro* da membrana de nanocelulose bacteriana com superfície modificada

#### 3.3.3.1 Citotoxicidade direta

Os hidrogéis de BNC são descritos na literatura como um biomaterial não-citotóxico para aplicações na engenharia de tecidos (CZAJA et al., 2007). Com o intuito de avaliar se a adsorção de PLC nas membranas de BNC iria afetar o potencial citotóxico em células de mamífero, foi realizado teste de citotoxicidade direta, de acordo com orientações contidas no guia para testes de citotoxicidade *in vitro* para dispositivos médicos ISO 10993-5: 2009.

De acordo com a Figura 20, os resultados obtidos pelo ensaio MTT demonstraram que os hidrogéis BNC e BNC-PLC não induziram resposta citotóxica em células L929 após 7 dias de cultura. Após 1, 3 e 7 dias de cultura em contato com as membranas BNC-PLC as células L929 apresentaram atividade metabólica de 90%, 108% e 138% respectivamente, em comparação com as membranas de BNC (100%).

Figura 20: Atividade metabólica de células L929 cultivadas em contato direto com membranas BNC e BNC-PLC durante 7 dias. \*P<0.05.



Baseado nos resultados descritos acima, podemos concluir que a adsorção da PLC aumentou a atividade metabólica das células L929, o que demonstra a ausência de toxicidade do material desenvolvido. Os resultados apresentados na figura 20 corroboram com outros trabalhos da literatura, os quais demonstram a ausência de citotoxicidade induzida

pela BNC combinada à poli-L-lisina (FÜRSATZ et al, 2017; SOUZA, 2011; CULEBRAS et al., 2015; BAZRAFESHAN E JEBALI, 2015).

### 3.3.3.2 Análise da morfologia celular

#### 3.3 3.2.1 Cultura de Fibroblastos humanos dermais primários (HDF)

Os fibroblastos humanos dermais primários (HDF) foram cultivados nas membranas BNC e BNC-PLC por um período de 7 dias. Micrografias representativas foram registradas nos dias 1, 3 e 7. De acordo com a Figura 21 foi possível observar confluência celular (formação de monocamada) com distribuição homogênea das células após 24 horas de cultura em ambas as amostras analisadas. Os fibroblastos apresentaram-se entrelaçados, com morfologia típica de sua espécie e alongamento do citoesqueleto. Após 3 dias de cultura observa-se nas bordas da monocamada formada, que houve proliferação e migração celular, evidenciado pela morfologia mais alongada e direcionada das células em ambas amostras. Após 7 dias de cultura foi possível observar um exacerbamento do perfil migratório das células cultivadas na membrana BNC-PLC, as quais apresentaram-se com o citoesqueleto mais alongado quando comparadas às cultivadas na BNC.

A figura 22 apresenta uma ampliação (aumento de 100x) das micrografias registradas no sétimo dia de cultura. Foi possível observar em detalhe, que os fibroblastos apresentaram morfologia típica de célula migratória, com presença de lamelipódios e filopódios nas duas amostras. Entretanto as células apresentaram migração direcionada, com prolongamentos mais intensos quando cultivadas na BNC-PLC.

No processo de migração celular a célula coordena a polimerização/despolimerização de filamentos de actina de seu citoesqueleto de maneira ordenada, de modo a promover deformações em sua membrana que a impulsionam pelo substrato permitindo a sua migração. Tais deformações são denominadas lamelipódios, que podem conter finas extensões chamadas filopódios. Os filopódios são formados por um núcleo de filamentos de actina que se alonga em uma direção única, estendendo a membrana plasmática como um fio. São polimerizadas paralelamente ao substrato, dando a esta projeção um aspecto de um leque que se espalha sobre uma superfície plana (TREPAT et al., 2015).

Figura 21: Micrografias representativas dos Fibroblastos humanos primários (HDF) cultivados nas membranas BNC e BNC-PLC ao longo de 7 dias (Aumento de 10x; barras correspondem a 100  $\mu$ m).

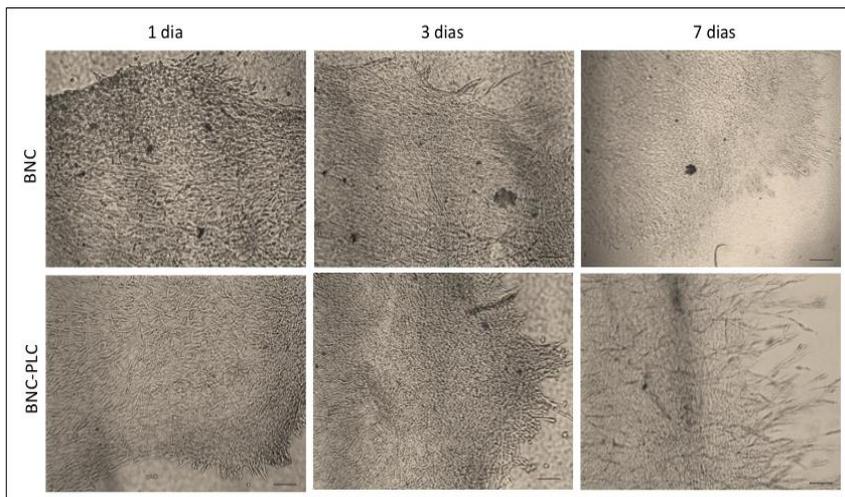
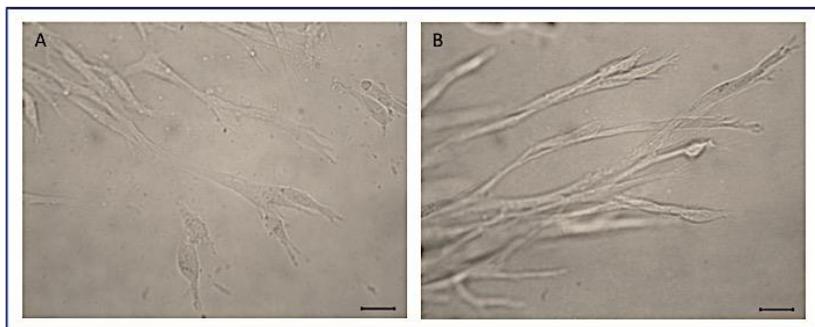


Figura 22: Micrografias representativas dos Fibroblastos humanos primários (HDF) com característica migratória cultivados nas membranas BNC (A) e BNC-PLC (B) por 7 dias (Aumento de 100x; barras correspondem a 100  $\mu$ m).



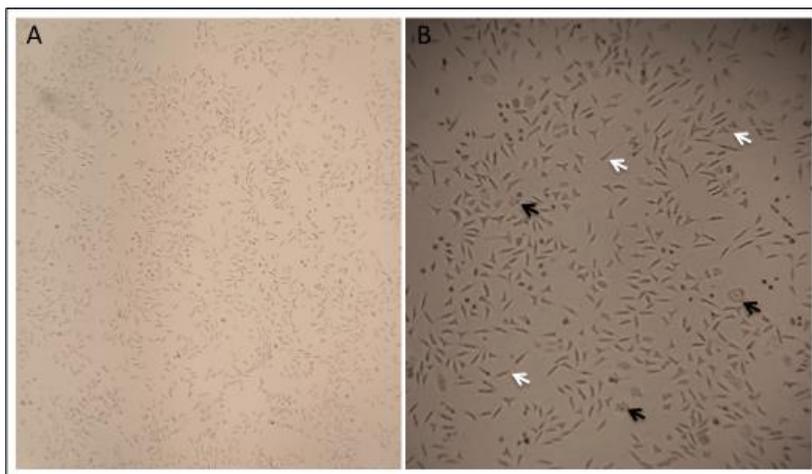
A avaliação da morfologia celular apresentada pela interação célula-célula e célula-material, no que se refere à organização do citoesqueleto, evidencia que as membranas apresentam um

microambiente propício para a proliferação e migração celular (GODINHO, 2014).

### 3.3.3.2 Modelo de cocultura em semeadura simultânea

Em teste preliminar de cocultura na placa de poliestireno foi possível observar que as duas linhagens distintas conseguiram aderir normalmente no fundo da placa quando cultivadas juntamente sob a mesma condição. As duas linhagens apresentaram morfologia usual de sua espécie, como mostrado na figura 23. Este resultado confirma a possibilidade de investigar o estabelecimento de cocultura das células epiteliais na superfície das membranas de nanocelulose, utilizando o mesmo microambiente e condições de cultivo para ambas.

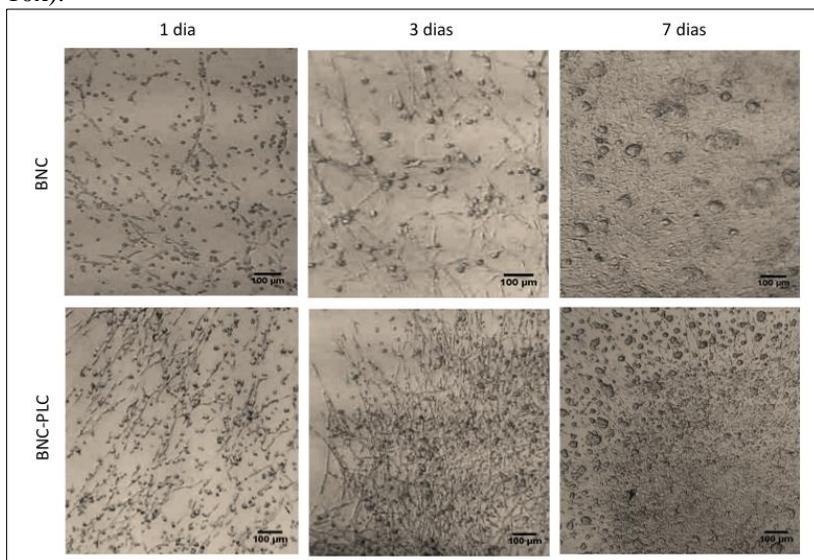
Figura 23: Micrografias representativas dos fibroblastos (setas brancas) e queratinócitos (setas pretas) em cocultura por 48 horas. Imagem obtida através de imagem de microscópio óptico. (A) micrografia original (4X) e (B) micrografia ampliada (10x).



O modelo de cocultura simultânea foi baseado em técnica descrita por Cerqueira e colaboradores (2014), com algumas modificações. Basicamente foi feita uma modificação na proporção em que os fibroblastos e queratinócitos foram semeados, na qual foi utilizada a proporção 1:1 ao invés de 1:5 entre queratinócitos e fibroblastos respectivamente.

De acordo com a Figura 24 foi possível observar que após 1 dia de cultivo, tanto os fibroblastos quanto os queratinócitos aderiram às membranas BNC e BNC-PLC. Os fibroblastos apresentaram-se com o citoesqueleto alongado, em maior número na membrana BNC-PLC, enquanto os queratinócitos estavam arredondados em iguais proporções em ambas membranas testadas (morfologia típica das linhagens em aderência). Após 3 dias de cultivo foi possível observar a proliferação dos fibroblastos, evidenciada pela formação de uma monocamada de células alongadas e interconectadas, mais expressiva na membrana BNC-PLC. Entretanto não foi possível observar a proliferação dos queratinócitos, os quais se mantiveram na mesma proporção, com morfologia arredondada, isoladamente. Em 7 dias de cultivo a monocamada de fibroblastos apresentou-se mais concentrada em ambas membranas, porém os queratinócitos permaneceram aderidos isoladamente. Tal comportamento sugere que os queratinócitos não encontraram nas membranas BNC e BNC-PLC um ambiente propício para aderência e proliferação.

Figura 24: Micrografias representativas dos Queratinócitos HacaT e Fibroblastos primários (HDF) em modelo de cocultura simultânea nas membranas BNC e BNC-PLC por um período de 7 dias. (Aumento de 10x).

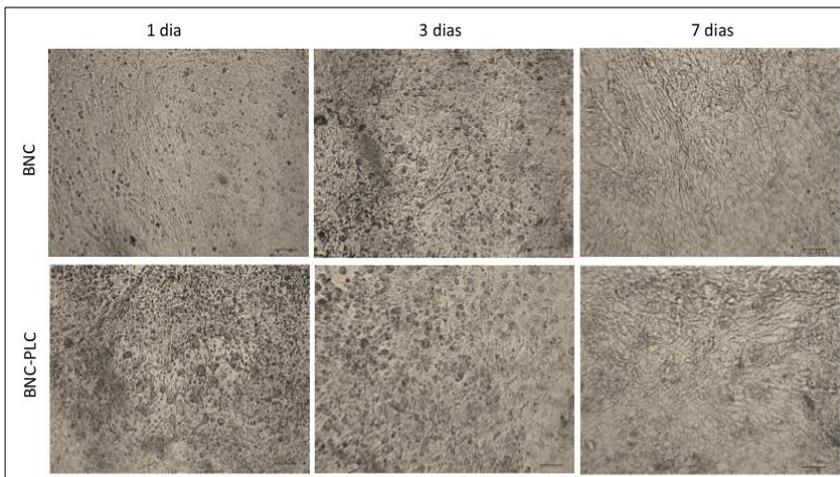


### 3.3.3.2.3 Modelo de cocultura organotípico

O modelo de cocultura organotípico foi baseado em técnica descrita por Lin e colaboradores (2013). Para tanto, foi desenvolvido um modelo equivalente à estrutura da pele humana utilizando fibroblastos primários e queratinócitos humanos cultivados em camadas sobre a membrana de nanocelulose. Os fibroblastos humanos dermais primários (HDF) foram semeados nas membranas de nanocelulose e após o período de incubação de 24h, os queratinócitos (HacaT) foram semeados sobre a monocamada de fibroblastos a fim de reproduzir um modelo similar à estrutura original da pele.

De acordo com a Figura 25, após 1 dia de cultivo em cocultura foi possível observar uma monocamada de queratinócitos aderidos sobre a camada de fibroblastos, evidenciada pela morfologia cubóide típica dos queratinócitos aderidos. Importante salientar que a análise morfológica apresentada neste estudo foi realizada em microscópio óptico, portanto não nos permite visualizar a camada de fibroblastos aderida abaixo dos queratinócitos. Entretanto os resultados apresentados na figura 21 suportam o fato de que, nas mesmas condições de cultivo, os fibroblastos estejam aderidos em monocamada, fornecendo suporte estrutural para o crescimento dos queratinócitos. Em 3 dias de cultivo observou-se um aumento na densidade da monocamada, sugestivo de proliferação celular em ambos grupos analisados. Após 7 dias de cultivo os queratinócitos mantiveram-se aderidos, e devido à alta densidade celular, não foi possível visualizar a morfologia da célula isoladamente. Pode-se afirmar apenas que existe uma monocamada densa, sugestiva de estratificação (diferenciação) dos queratinócitos em processo de formação das camadas epidérmicas.

Figura 25: Micrografias representativas dos Queratinócitos HacaT e Fibroblastos primários (HDF) em modelo de cocultura organotípica nas membranas BNC e BNC-PLC por um período de 7 dias (Aumento de 10x, barras correspondem a 100  $\mu$ m).



O presente resultado qualitativo não nos permite afirmar sobre a viabilidade das células em cocultura organotípica. Portanto faz-se necessária a execução de testes de atividade metabólica para confirmar a superioridade deste modelo em relação ao modelo de semeadura simultânea.

### 3.3.3.3 Análise da atividade metabólica (MTS)

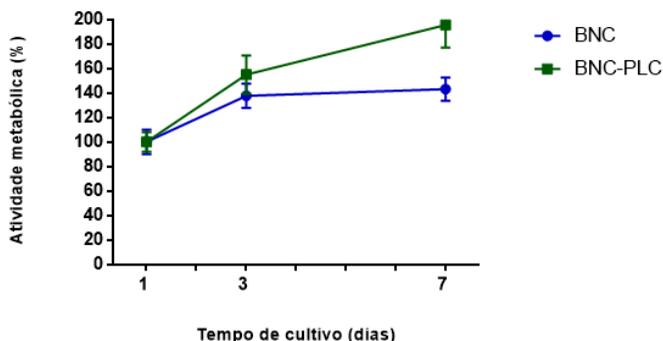
De acordo com a metodologia descrita neste estudo, o ensaio de atividade metabólica foi realizado para alcançar dois objetivos: determinar se a adsorção da Poli-L-lisina-colesterol altera a atividade metabólica das células cultivadas na BNC e BNC-PLC e determinar a eficiência dos dois modelos de cocultura desenvolvidos neste estudo.

As Figuras 26 e 27 demonstram os resultados obtidos nos ensaios de análise da atividade metabólica de fibroblastos humanos primários e queratinócitos humanos HacaT, respectivamente, cultivados separadamente sobre as membranas BNC e BNC-PLC por um período de 7 dias.

De acordo com a Figura 26, foi possível observar que houve um aumento significativo da atividade metabólica dos fibroblastos primários cultivados tanto na membrana BNC, quanto na membrana BNC-PLC ao longo dos 7 dias, indicando que as células proliferaram sobre as

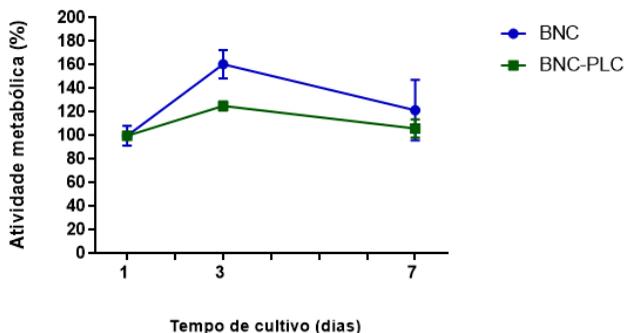
membranas. Em 3 dias de análise as células cultivadas na BNC e BNC-PLC aumentaram a atividade metabólica em 40% e 60%, respectivamente (diferença não estatisticamente significativa). Entretanto pode-se observar que ao final dos 7 dias os fibroblastos cultivados na BNC-PLC apresentaram atividade metabólica maior, em torno de 100%, enquanto as células cultivadas na BNC proliferaram em torno de 50%. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ )

Figura 26: Atividade metabólica de fibroblastos humanos primários cultivados sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.



De acordo com os resultados descritos na Figura 27, foi possível observar que houve estagnação da atividade metabólica dos queratinócitos humanos cultivados tanto na membrana BNC, quanto na membrana BNC-PLC ao longo dos 7 dias. Em 3 dias de análise as células cultivadas na BNC e BNC-PLC apresentaram um aumento significativo da atividade metabólica em 20% e 60%, respectivamente. Porém foi possível observar que ao final dos 7 dias de análise houve uma diminuição da atividade metabólica dos queratinócitos, sugerindo que este tipo celular não reconheceu a BNC e BNC-PLC como substratos propícios para proliferação. Importante salientar que apesar da diminuição da atividade metabólica apresentada no último dia das análises, comparada ao terceiro dia de cultivo, as membranas não apresentaram potencial citotóxico em relação ao primeiro dia de cultivo. Foi possível afirmar apenas que os queratinócitos não apresentaram potencial proliferativo em ambas membranas testadas.

Figura 27: Atividade metabólica de queratinócitos humanos cultivados sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.

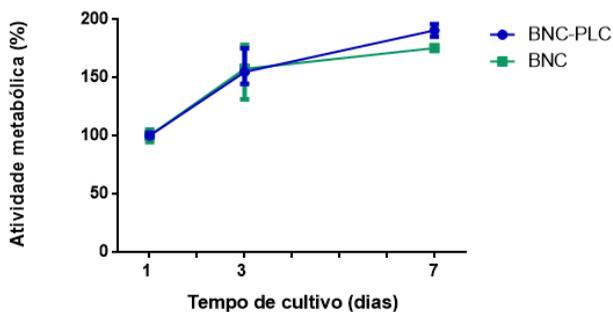


As Figuras 28 e 29 demonstram os resultados obtidos nos ensaios de análise da atividade metabólica de fibroblastos humanos primários e queratinócitos humanos HacaT cocultivados nas membranas BNC e BNC-PLC por um período de 7 dias.

De acordo com a Figura 28, foi possível observar que houve um aumento significativo da atividade metabólica das células cocultivadas em modelo de semeadura simultânea tanto na membrana BNC, quanto na membrana BNC-PLC ao longo dos 7 dias. Em 3 dias de análise as células cocultivadas na BNC e BNC-PLC aumentaram a atividade metabólica em 50% similarmente nas duas membranas testadas. Ao final dos 7 dias as células cocultivadas na BNC-PLC apresentaram atividade metabólica superior, em torno de 90%, enquanto as células cultivadas na BNC aumentaram sua atividade em torno de 60%. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Apesar do aumento observado na atividade metabólica das células cocultivadas nas duas membranas, acredita-se que tal resultado pode ser atribuído apenas à atividade dos fibroblastos, pois é possível observar um perfil similar ao obtido nos resultados apresentados na Figura 26. Levando em conta a metodologia empregada no modelo de cocultura simultânea, os dois tipos celulares estão em contato direto com as membranas de nanocelulose, e tal cenário não é favorável para os queratinócitos. De acordo com a Figura 27, foi possível observar que os queratinócitos não apresentaram aumento da sua atividade metabólica ao longo dos 7 dias de análise. Portanto este

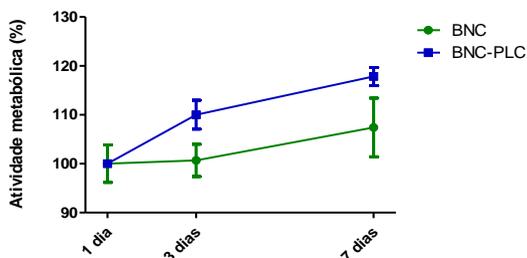
resultado permite-nos concluir que o modelo de cocultura simultânea em membranas de BNC ou BNC-PLC não é funcional para os dois tipos celulares distintos ao mesmo tempo.

Figura 28: Atividade metabólica de fibroblastos e queratinócitos humanos cocultivados simultaneamente sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.



A Figura 29 apresenta os resultados da análise da atividade metabólica das células cocultivadas em modelo organotípico tanto na membrana BNC, quanto na membrana BNC-PLC ao longo dos 7 dias. No modelo de cocultura organotípico apenas os fibroblastos estão em contato direto com a nanocelulose, formando uma monocamada (*feeder layer*) para fornecer suporte estrutural aos queratinócitos. Em 3 dias de análise as células cocultivadas na BNC e BNC-PLC aumentaram a atividade metabólica em 5% e 10% respectivamente. Ao final dos 7 dias as células cocultivadas na BNC-PLC apresentaram atividade metabólica superior, em torno de 20%, enquanto as células cocultivadas na BNC aumentaram sua atividade em torno de 10%. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Figura 29: Atividade metabólica de fibroblastos e queratinócitos humanos cocultivados em modelo organotípico sobre a superfície de membranas de nanocelulose bacteriana (BNC e BNC-PLC); análise em 1, 3 e 7 dias. Os valores estão expressos como % de atividade metabólica, mostrando a sua evolução em relação ao primeiro dia de cultura.



Aparentemente, a evolução da atividade metabólica no modelo de cocultura organotípico é mais lenta quando comparada ao modelo de cocultura simultâneo. Porém acredita-se que os dois tipos celulares estejam metabolicamente ativos, na mesma proporção, o que não acontece no modelo de cocultura simultâneo. Portanto o presente ensaio permite-nos afirmar que o modelo de cocultura organotípico é melhor e mais seguro do que o modelo de semeadura simultânea. Também foi possível observar que adsorção da Poli-L-lisina-colesterol favoreceu a atividade metabólica das células cultivadas na BNC-PLC, em todos os grupos analisados.

#### 3.3.3.4 Análise da viabilidade celular qualitativa (live and dead)

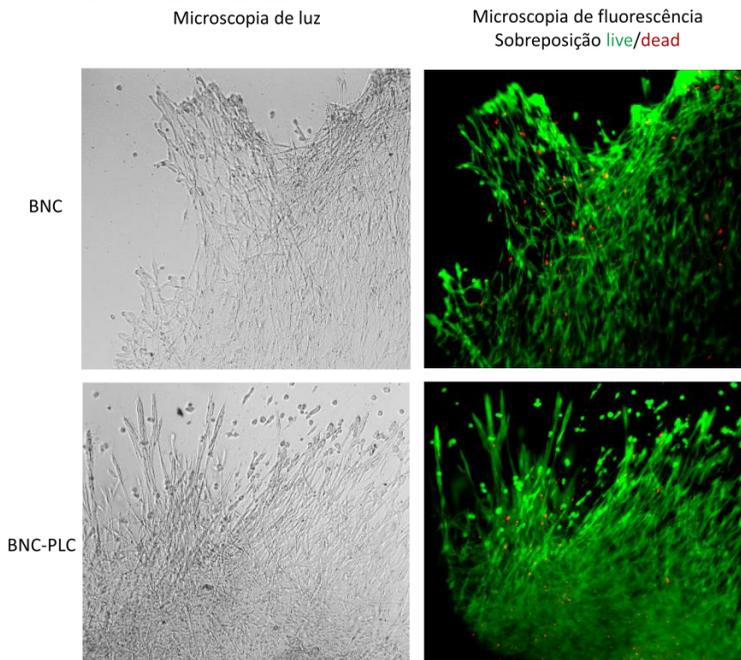
O resultado do ensaio de atividade metabólica por MTS apresentado na sessão anterior não nos permitiu distinguir a atividade dos fibroblastos e queratinócitos separadamente quando em cocultura organotípica. Não foi possível afirmar se os queratinócitos em cocultura organotípica apresentavam-se metabolicamente ativos ou não após os 7 dias de cultivo. Para confirmar se os dois tipos celulares ainda encontravam-se viáveis após 7 dias de cocultura organotípica, foi realizado o ensaio live and dead.

Este ensaio fluorescente cora as células metabolicamente viáveis em verde (calceína), e as células mortas ou metabolicamente inativas em vermelho (homodímero de etídeo). O teste se baseia no princípio de que a calceína é permeável a membrana celular, porém, após ser clivada por esterases contidas em células vivas, a mesma se torna incapaz de atravessar a membrana, permanecendo retida dentro da célula e levando a

um aumento da fluorescência verde ao longo do corpo celular. O homodímero de etídeo só é capaz de permear células que apresentem membrana danificada, ou seja, em processo de morte. Após permear a membrana celular, o homodímero de etídeo se liga aos ácidos nucléicos, emitindo fluorescência vermelha (DÓRIA, 2013). A imagem de fluorescência apresenta as sobreposições das micrografias capturadas em microscópio de fluorescência equipado com o filtro 488 para as imagens verdes e 633 para as imagens vermelhas.

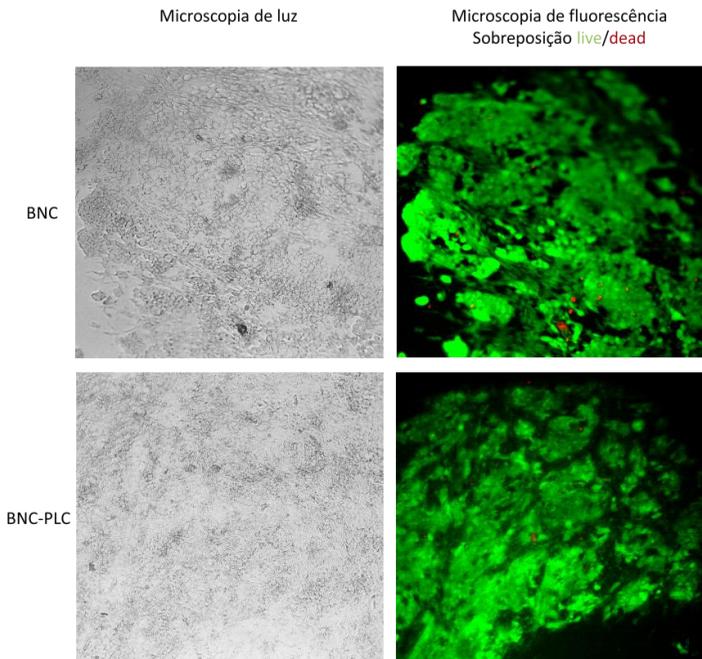
A Figura 30 apresenta os resultados da análise qualitativa de viabilidade dos fibroblastos humanos primários cultivados ao longo de 7 dias nas membranas BNC e BNC-PLC. Pode-se observar que os fibroblastos cultivados isoladamente apresentaram-se metabolicamente ativos após 7 dias de cultivo nas duas membranas testadas. A quantidade de células mortas ou metabolicamente inativas é insignificante nas duas amostras, porém observou-se um leve aumento na membrana BNC. Ainda que o objetivo principal deste ensaio não seja avaliar morfologia celular, estes resultados corroboram com as observações realizadas quanto ao alongamento do citoesqueleto, o que comprova a boa adaptação dos fibroblastos cultivados nas membranas BNC e BNC-PLC.

Figura 30: Fibroblastos humanos primários metabolicamente ativos após 7 dias de cultivo sobre as membranas de nanocelulose BNC (controle) e BNC-PLC. As células vivas estão coradas em verde e as células mortas estão coradas em vermelho.



A Figura 31 apresenta os resultados da análise qualitativa da viabilidade dos fibroblastos humanos primários e queratinócitos Hacat em modelo de cocultura organotípica ao longo de 7 dias nas membranas BNC e BNC-PLC. Foi possível observar que os queratinócitos cultivados sobre a monocamada de fibroblastos apresentaram-se metabolicamente ativos após 7 dias de cultivo nas duas membranas testadas. A quantidade de células mortas ou metabolicamente inativas é insignificante nas duas amostras. A imagem de fluorescência apresentada, nos permite identificar com clareza a morfologia típica dos queratinócitos aderidos sobre os fibroblastos, o que não acontece na imagem de microscopia de luz. É possível diferenciar claramente a monocamada de queratinócitos, a qual apresenta-se em grumos arredondados, da monocamada de fibroblastos (evidenciada na figura 30) a qual apresenta-se como uma rede de células alongadas e interconectadas.

Figura 31: Fibroblastos humanos primários e Queratinócitos humanos em modelo de cocultura organotópica metabolicamente ativos após 7 dias de cultivo sobre as membranas de nanocelulose BNC e BNC-PLC.



O presente resultado permitiu concluir que os dois tipos celulares encontram-se metabolicamente viáveis após 7 dias de cultivo em cocultura organotópica, confirmando a eficiência do modelo desenvolvido.

### 3.3.3.5 Análise da adesão celular

A adesão é essencial na comunicação celular e regulação, e é de fundamental importância no desenvolvimento e manutenção de tecidos. As interações mecânicas entre uma célula e sua matriz extracelular podem influenciar e controlar o comportamento e a função das células (KHALILI E AHMAD, 2015). Para que ocorra uma boa interação *scaffold*-célula é necessário que se estabeleça inicialmente a adesão celular ao substrato. Tal processo está relacionado com a adsorção de proteínas adesivas e é direcionado por características do substrato como

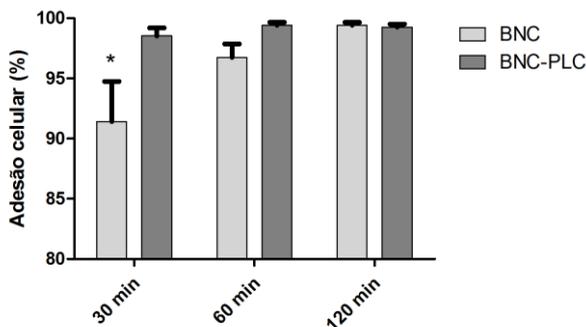
hidrofilicidade, hidrofobicidade e disposição de cargas elétricas de superfície (NASCIMENTO E LOMBELLO, 2016).

Neste ensaio foram utilizados apenas fibroblastos humanos primários, levando em conta a eficiência do desenvolvimento do modelo de cocultura organotípico e a baixa atividade metabólica dos queratinócitos cultivados nas membranas de BNC e BNC-PLC. No modelo de cocultura organotípico, apenas os fibroblastos estão em contato direto com a membrana de BNC, fornecendo uma monocamada de suporte (feeder layer) para o crescimento dos queratinócitos.

A capacidade de adesão dos fibroblastos foi testada nas diferentes membranas nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos. As células apresentaram uma rápida adesão às membranas BNC e BNC-PLC. Em duas horas as células encontravam-se completamente aderidas nos dois grupos avaliados. Entretanto observou-se que as células aderiram mais rapidamente quando semeadas na membrana BNC-PLC.

De acordo com o gráfico apresentado na figura 32, em 30 minutos, cerca de 98% das células já haviam aderido à BNC-PLC enquanto 93% ( $p < 0,001$ ) haviam aderido à BNC. Em 60 minutos praticamente todas as células já haviam aderido à BNC-PLC enquanto 96% encontravam-se aderidas à BNC. Apenas em 120 minutos observou-se um perfil de aderência similar nos dois grupos analisados (aderência total).

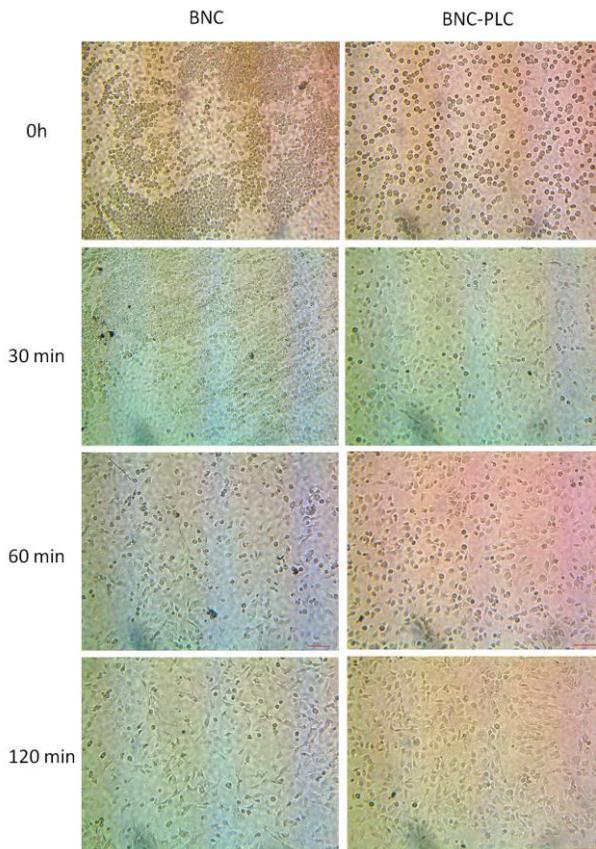
Figura 32: Capacidade de adesão de Fibroblastos humanos primários às membranas de nanocelulose BNC e BNC-PLC ao longo do tempo (análise em 30, 60 e 120 min). \* $p < 0,001$ ; Two way Anova e Bonferroni Post hoc test.



A rápida aderência das células na membrana BNC-PLC pode ser atribuída à interação eletrostática e à interação hidrofóbica das células com a membrana, promovida pela modificação de superfície da BNC através da adsorção da PLC. O presente resultado permite-nos confirmar que a modificação de carga da superfície da BNC é eficaz para a adesão de fibroblastos humanos primários.

Concomitantemente à análise, as células semeadas nas membranas foram fotografadas em microscópio óptico para registro da imagem em cada intervalo de tempo correspondente. De acordo com as micrografias apresentadas na figura 33, foi possível observar que no exato momento da semeadura (0h), as células apresentaram-se homoganeamente distribuídas na superfície da BNC-PLC, o que não pode ser observado na membrana BNC, onde as células estavam depositadas em grumos. Importante salientar que o número de células semeadas foi o mesmo em ambas amostras. Tal fato é sugestivo da presença da PLC adsorvida homoganeamente sobre a superfície da BNC, estimulando a as interações eletrostática e hidrofóbica entre as células e a membrana modificada. Em 30 minutos ainda foi possível observar a distribuição irregular das células depositadas sobre a BNC e a distribuição homogênea das células já aderidas na BNC-PLC. Apenas partir de 60 minutos, as células na BNC apresentaram morfologia típica de adesão e distribuição, similar ao observado na BNC-PLC.

Figura 33: Micrografias representativas da adesão de Fibroblastos humanos primários às membranas de nanocelulose BNC e BNC-PLC ao longo do tempo (em 0, 30, 60 e 120 min; aumento 10X).



### 3.3.3.6 Análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real

#### 3.3.3.6.1 Extração de RNA

O RNA total dos fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas BNC e BNC-PLC foi extraído e purificado utilizando-se o kit RNeasy plant (Qiagen, USA). Para tanto, as células foram semeadas na densidade de  $1 \times 10^6$  células/membrana e cultivadas

por um período de 24h. As células cultivadas diretamente sobre a placa de poliestireno foram utilizadas como controle.

Estudos anteriores reportaram a extração de RNA de células cultivadas na nanocelulose, tais como: células neuronais (ZHU et al., 2013), condrócitos (ÁVILA et al., 2015), células-tronco de tecido adiposo (ZHANG et al; 2013) e outros. Entretanto ambos descreveram o processo de extração de RNA removendo as células do biomaterial antes do procedimento. A remoção das células do biomaterial é eficiente em termos de redução da contaminação do ácido nucleico pelos resíduos da celulose mas por outro lado pode alterar a expressão de genes relacionados com a adesão celular, prejudicando a análise. Outros estudos envolveram a extração de RNA de fibroblastos, porém cultivados em biomateriais distintos: Nanofibras de algodão (PEREIRA et al, 2013), scaffolds de proteína de soja (LIN et al., 2013), poly(ethylene glycol)-g-chitosan (TSAO et al, 2014).

Até o presente momento, o método aqui apresentado foi o primeiro a permitir o isolamento de RNA de fibroblastos humanos dermais primários cultivados diretamente sobre a BNC. A obtenção de ácidos nucleicos de alta qualidade é um passo crítico em estudos de biologia molecular, principalmente quando se utilizam biomateriais complexos como a nanocelulose bacteriana. O método desenvolvido neste estudo é rápido e aplicável para extrair RNA de alta pureza de células mamárias cultivadas em membranas de BNC, sem necessidade de remoção das células cultivadas sobre o biomaterial. As etapas críticas incluíram a lise mecânica em ultrassom para romper a estrutura celular bem como as fibras de nanocelulose e a separação dos ácidos nucleicos dos detritos e contaminantes, utilizando o filtro de microcentrífuga homogenizador Qiashredder (Qiagen, EUA).

O rendimento do RNA extraído das amostras e o grau de pureza está descrito na Tabela 6.

Tabela 6: Concentração e grau de pureza do RNA total extraído de Fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose bacteriana BNC e BNC-PLC. As células cultivadas na placa de poliestireno foram utilizadas como controle.

ID	Amostras	Concentração (ng/μl)*	Grau de Pureza ( $A_{260}/A_{280}$ )**
1	Controle 1	78,51	2,04
2	Controle 2	85,7	2,08
3	Controle 3	151,8	2,06
4	BNC 1	102,5	2,05
5	BNC 2	133,9	2,07
6	BNC 3	315,1	2,09
7	BNC-PLC 1	176,1	2,06
8	BNC-PLC 2	185,3	2,05
9	BNC-PLC 3	146,9	2,05

\*Concentração de RNA=  $A_{260}$  x fator de diluição (100) x 40

\*\*Os valores  $A_{260}/A_{280}$  indicam a razão entre as absorvâncias medidas a 260nm e 280nm em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher).

A pureza do RNA foi avaliada pelas razões entre os valores da absorvância em 260/280nm. As amostras analisadas apresentaram quantidades de RNA acima de 50 ng/μl com grau de pureza entre 1,7 e 2,0, características consideradas adequadas para análise de expressão gênica. O protocolo aqui desenvolvido demonstrou ser eficiente para extração de RNA de células cultivadas em biofilmes polissacarídeos, podendo ampliar o seu espectro de aplicação para extração de RNA de outros organismos.

### 3.3.3.6.2 Amplificação dos genes

As análises de qPCR foram realizadas para determinação dos níveis de mRNA de Colágeno tipo 1, Integrina  $\alpha 1$  e Integrina  $\alpha 2$  expressos pelos fibroblastos cultivados sobre as membranas BNC e BNC-PLC por um período de 24 horas. Tais genes foram escolhidos devido à sua importância no processo de adesão celular à superfície da BNC.

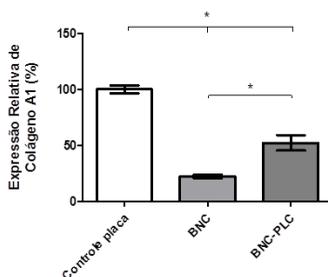
A adesão entre célula e substrato é realizada pela família das integrinas, que é composta por 22 heterodímeros de 2 tipos de subunidades ligadas não covalentemente entre si. Essa diversidade de estruturas ocorre devido às várias possibilidades de ligantes (colágeno, laminina, fibronectina, osteopontina, vitronectina). Cada tipo celular expressa um tipo de integrina, a qual irá se ligar de forma específica à

uma proteína da matriz extracelular, conforme descrito anteriormente na Figura 2 (RIPPA et al., 2013). No caso dos fibroblastos dermais, especificamente, são expressas as integrinas  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$  que se ligam ao colágeno da matriz extracelular. O colágeno tipo I, o tipo de colágeno predominante na pele humana, é produzido principalmente por fibroblastos, e é importante para a adesão celular e migração dentro dos tecidos conectivos (TSAO ET AL., 2014).

A adesão celular a um biomaterial está relacionada a dois fenômenos diferentes: i) fase de anexação, que ocorre rapidamente, envolve eventos como ligações físico-químicas entre as células e a superfície do material; ii) fase de adesão, que ocorre posteriormente, e envolve diversas moléculas biológicas como proteínas de matriz extracelular, proteínas de membrana celular e do citoesqueleto. Tais moléculas interagem conjuntamente para induzir a transdução do sinal, promovendo a ação de fatores de transcrição e conseqüentemente regulando a expressão gênica (NASCIMENTO E LOMBELLO, 2016).

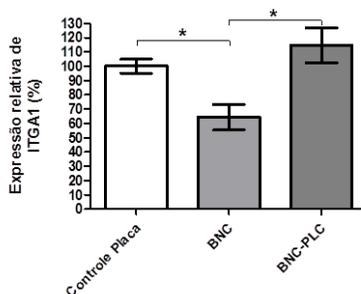
Os resultados de análise de expressão gênica desenvolvidos neste estudo estão apresentados a seguir. A figura 34 apresenta a expressão relativa do gene *Col1A1* em fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose por um período de 24h. Comparado ao controle placa (considerado 100%), foi possível detectar uma expressão de 30% nas células cultivadas na BNC e 60% na BNC-PLC. Apesar de a expressão apresentar-se diminuída em comparação ao controle, o resultado demonstra que mesmo em condições complexas de cultivo em 3D, as células foram capazes de interagir com a matriz de nanocelulose e induzir fatores de transcrição para regular a expressão de colágeno tipo 1. Surpreendentemente, pode-se observar um aumento significativo da expressão em 30% nas células cultivadas na BNC-PLC em comparação à BNC, confirmando a eficiência da modificação de superfície proposta neste estudo.

Figura 34: Análise da expressão de colágeno (*Col1A1*) em fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose por um período de 24h. Os resultados foram normalizados a partir da expressão do gene  $\beta$ -actina. Os valores foram apresentados como % de expressão relativa ao controle. \* $p < 0,05$  ANOVA e Teste de Tukey.



A Figura 35 apresenta a expressão relativa do gene *Itga1*. Foi possível detectar uma expressão de 75% nas células cultivadas na BNC e 115% na BNC-PLC, comparado ao controle placa (100%). Interessantemente, os níveis de expressão foram maiores em 40% nas células cultivadas na BNC-PLC quando comparados à BNC (diferença estatisticamente significativa).

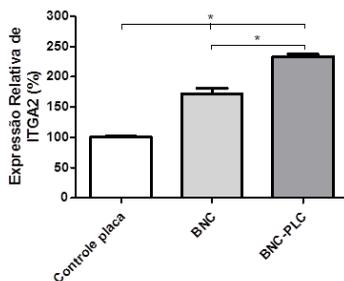
Figura 35: Análise da expressão de Integrina  $\alpha 1$  (*Itga1*) em fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose por um período de 24h. Os resultados foram normalizados a partir da expressão do gene  $\beta$ -actina. Os valores foram apresentados como % de expressão relativa ao controle. \* $p < 0,05$  ANOVA e Teste de Tukey.



A Figura 36 apresenta a expressão relativa do gene *Itga2*. Supreendentemente foi possível detectar a expressão de 180% nas células

cultivadas na BNC e 230% na BNC-PLC, ambos níveis significativamente superiores aos achados no controle placa (100%). Os níveis de expressão foram maiores em 50% nas células cultivadas na BNC-PLC quando comparados à BNC (diferença estatisticamente significativa), confirmando mais uma vez a eficiência da matriz BNC-PLC.

Figura 36: Análise da expressão de Integrina  $\alpha 2$  (*Itga2*) em fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas de nanocelulose por um período de 24h. Os resultados foram normalizados a partir da expressão do gene  $\beta$ -actina. Os valores foram apresentados como % de expressão relativa ao controle. \* $p < 0,05$  ANOVA e Teste de Tukey.



No presente estudo, o aumento na expressão de integrinas  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  pode estar relacionado com o aumento da morfologia migratória apresentado pelos fibroblastos cultivados na membrana BNC-PLC (Figura 22). No processo de migração celular, as extensões do citoesqueleto (lamelipódias e filopódias) formam adesões imaturas junto ao substrato denominadas adesões focais. Estas são formadas por agregados de proteínas da matriz extracelular, integrinas e proteínas do citoesqueleto organizados de cada lado da membrana que são caracteristicamente dinâmicos e iniciam o processo de sinalização celular (FERRAZ E FERNANDES, 2014).

Estudos anteriores de Szulgit et al. 2002 descreveram a alteração da expressão da integrina  $\alpha 1\beta 1$  em fibroblastos em quelóides, cicatrizes hipertróficas e em úlceras induzidas por radiação. Eles demonstraram que as condições extracelulares podem ser cruciais para a manutenção da expressão da integrina fibroblástica. Em outras palavras, seus resultados sugerem que os heterodímeros de integrina  $\alpha 1\beta 1$  podem funcionar como um regulador na derme *in vivo*.

Fujimura e colaboradores (2007) investigaram o envolvimento e as características funcionais das integrinas na derme, através de um estudo *in vitro* utilizando fibroblastos cultivados em *scaffolds* de

colágeno. Foi possível observar que as contrações mediadas por fibroblastos dependem da integrina  $\alpha 2\beta 1$  e as integrinas  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$  são receptores importantes que regulam a expressão de colágeno e matriz metaloproteinase-1.

O primeiro passo para a interação célula/biomaterial é a aproximação e adesão, através de forças físicas e químicas. Após o primeiro contato, a célula passará a expressar genes que produzirão proteínas adesivas (resposta biológica). O presente estudo foi o primeiro a analisar e identificar a expressão diferenciada dos genes colágeno tipo 1, integrina  $\alpha 1$  e integrina  $\alpha 2$  em fibroblastos humanos dermais primários cultivados em membranas de nanocelulose. Este achado elucidou o mecanismo pelo qual a célula se adapta à nanocelulose para proliferar de maneira mais eficiente e organizada.

---

### 3.4 CONCLUSÕES

O objetivo principal do estudo deste capítulo foi modificar a superfície da BNC, através da adsorção de Poli-L-Lisina-Colesterol para favorecer a adesão e proliferação celular através da atuação de forças eletrostáticas (interação com a polilisina) e hidrofóbicas (interação com o colesterol). As análises para caracterização da BNC-PLC confirmaram a presença do polímero adsorvido na superfície da BNC e a ausência de nanopartículas depositadas sobre a superfície, sugerindo o desenovelamento do polímero sobre as fibras. As análises de biocompatibilidade *in vitro* revelaram a ausência de toxicidade, bem como o aumento da atividade metabólica e adesão de fibroblastos humanos primários. Os fibroblastos e queratinócitos cocultivados em modelo organotípico nas membranas BNC-PLC demonstraram morfologias típicas de suas linhagens, indicando uma boa adaptação celular à modificação de superfície. A análise por qPCR em tempo real indicou um aumento significativo da expressão de colágeno, integrina  $\alpha 1$  e integrina  $\alpha 2$  nos fibroblastos cultivados sobre a BNC-PLC.

Importante ressaltar que os resultados aqui apresentados são inéditos em alguns aspectos, tais como:

- i) Modificação de superfície da BNC utilizando o polímero Poli-L-Lisina-Colesterol, para dupla interação química com as células.
- ii) Desenvolvimento do protocolo de extração de RNA de fibroblastos humanos primários cultivados sobre as membranas BNC e BNC-PLC, utilizando a etapa de sonicação para lise celular, dispensando a necessidade de remover as células do *scaffold*.

iii) Análise da expressão gênica de integrinas e colágeno em fibroblastos cultivados sobre as membranas.

As análises *in vitro* evidenciaram que a membrana modificada foi capaz de suportar a adesão e a viabilidade celular, no período de 7 dias, com aumento da confluência celular, interação célula-material e expressão de genes chave no processo de adesão. Dadas as suas características apresentadas e bicompatibilidade celular, o scaffold desenvolvido apresenta potencial para aplicação na regeneração tecidual da pele, mais especificamente para aplicação tópica em tratamento de feridas. Os resultados obtidos até o momento são promissores e incentivam a continuação das investigações relacionadas aos mecanismos celulares e moleculares de adaptação das células em cocultura na BNC-PLC.

## 4. ANÁLISE DA SEGURANÇA DE APLICAÇÃO TÓPICA DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA: TESTE CLÍNICO FASE I

### 4.1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Muitos pesquisadores anseiam pela chance de criar um curativo ideal, que não cause nenhum dano ao paciente e facilite uma cicatrização perfeita (FOHN E BANNASCH, 2007). Nesta perspectiva, o grupo de pesquisa em Engenharia Genômica e Tecidual do Laboratório de tecnologias integradas - InteLab/UFSC tem recentemente focado no desenvolvimento de tal material terapêutico, utilizando para isso hidrogéis de nanocelulose bacteriana (BNC) como biomaterial base para o desenvolvimento de novas estratégias para a reparação tecidual (RECOUVREUX *et al.*, 2011).

A presente proposta de estudo clínico está inserida no contexto do projeto de PD&I intitulado PROPELE - Engenharia Tecidual e Avaliação Pré-clínica e Clínica de Pele Biopolimérica Imunoativa (Chamada Pública MCT/FINEP/MS/SCTIE/DES – AT – FÁRMACOS E MEDICAMENTOS – 4/2010) cujo objetivo geral é estabelecer condições científicas, técnicas e mercadológicas para o desenvolvimento de produtos inovadores de pele artificial biopolimérica com propriedades bioativas, com base em membranas de hidrogel de celulose bacteriana (CB) aqui também referida como Nanocelulose bacteriana (BNC), enriquecidas com polissacarídeos extraídos da *Aloe vera* (BNC-Aloe). O compósito BNC-Aloe básico é resultado de um projeto cooperativo anterior financiado pela FINEP e SEBRAE com as empresas parceiras do projeto, e foi objeto de pedido de patente nacional, recentemente reivindicada pelo SEBRAE como um *case* de sucesso. Tal proposta pretende ampliar a escala de produção do compósito, passando pelos estágios de bancada, piloto e industrial.

Em parceria com empresas co-financiadoras, formulações básicas de BNC e *Aloe vera* foram desenvolvidas e testadas em modelos pré-clínicos, visando as aplicações terapêuticas em lesões de pele promovidas por queimaduras, úlceras, acidentes, e outras aplicações. Para os testes pré-clínicos, foram avaliadas a toxicidade e eficácia do compósito BNC-Aloe produzidos previamente. Os ensaios *in vitro* avaliaram a adesão e proliferação celular sobre o biomaterial em teste, para o conhecimento de sua citotoxicidade perante ao mecanismo de

cicatrização. Os ensaios *in vivo*, avaliaram a toxicidade e eficácia dos hidrogéis em camundongos isogênicos Balb/c (*Mus musculus*), através de modelo experimental de excisão de pele.

Nos ensaios *in vitro*, fibroblastos da linhagem L929 foram semeados sobre a superfície dos biomateriais e a sua toxicidade foi caracterizada através do ensaio colorimétrico com MTS. Este ensaio identificou a atividade mitocondrial de células vivas, cultivadas nos períodos de 24 e 48 horas. Em 24 horas, não foi observado efeito citotóxico em nenhum dos grupos tratados com membranas de BNC compósitas com frações de gel, gel total e frações polissacarídicas a 20, 40 ou 60% de *Aloe vera*. Ao contrário, no mesmo período, os grupos tratados com o gel e com o gel total apresentaram um aumento significativo de células metabolicamente viáveis. Em 48 horas de cultura, também não foi observado efeito citotóxico em nenhum dos grupos de tratamento (GODINHO, 2013).

Os ensaios *in vivo* foram realizados no Biotério Setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental (Labioex), situado no Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas, da UFSC, utilizando camundongos isogênicos Balb/c (*Mus musculus*), através de modelo experimental de excisão de pele. O modelo de experimentação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da UFSC, sob o número de protocolo PP00620. Para tanto, camundongos fêmeas com peso de  $20 \pm 2$  g e cerca de 60 dias de vida, foram submetidos à excisão da pele após a administração por via intraperitoneal de 0,1 mL/10 g de solução anestésica. Após a excisão de 1 cm quadrado de pele, a avaliação da atividade cicatrizante foi realizada em 6 animais por grupo de tratamento (n=6), durante o tempo de 15 dias. Os grupos foram divididos em: Controle tratado com solução salina (0,9 % m/v), grupo tratado com membrana de nanocelulose bacteriana pura e grupo tratado com membrana de nanocelulose bacteriana contendo *Aloe vera* a 60%. Foram realizados registros fotográficos nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 e as lesões foram mensuradas utilizando o software image J.

Os resultados *in vivo* demonstraram que a utilização de membrana de nanocelulose bacteriana contendo ou não *Aloe vera* foi eficaz no tratamento das lesões quando comparados ao controle. Foi possível observar satisfatória absorção de exsudado e manutenção da umidade da ferida, bem como promoção do isolamento térmico, proteção mecânica do local da lesão cutânea e proteção contra microrganismos patogênicos. Não foi observado nenhum sinal de

irritação, edema, descamação ou prurido, indicando a ausência de sinais alérgicos ao biomaterial aplicado.

A ausência de toxicidade, aliada à comprovada atividade cicatrizante *in vivo*, coloca o compósito BNC-Aloe como um dispositivo promissor para o tratamento de úlceras em humanos. Desta forma, o presente estudo tem como meta principal a elaboração de um protocolo e execução do ensaio clínico de fase I para a avaliação da segurança de aplicação da BNC modificada em seres humanos, utilizando o compósito BNC-Aloe como modelo e primeiro passo para a conclusão da sua caracterização terapêutica em humanos e futuramente obtenção do registro do tratamento em estudo.

---

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 *Tipo de estudo*

Trata-se de um estudo clínico de fase I, duplo-cego, randomizado. Desta forma, foi avaliada a evolução de um grupo de voluntários, que foram submetidos à aplicação tópica de membranas de nanocelulose bacteriana pelo período de um mês.

### 4.2.2 *População*

A população alvo deste estudo foi constituída de indivíduos saudáveis, com idade entre 18 e 60 anos, de ambos os sexos, usuários do campus da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC que aceitaram os termos para participar voluntariamente da pesquisa e se enquadraram nos critérios de inclusão.

Para definição do tamanho da amostra, utilizou-se as orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que preconiza de 20 a 100 indivíduos para compor a amostra de pesquisa clínica fase I. Desta forma, levando em conta a quantidade mínima exigida de indivíduos, a população do estudo constituiu-se de 20 pessoas.

Foram elegíveis pessoas adultas acima de 18 anos, de ambos os sexos, usuárias do Campus da UFSC, sem relato de: doenças infectocontagiosas ou parasitárias, processos infecciosos ou alérgicos aos componentes da formulação, uso de antimicrobianos, imunossupressores, antialérgicos, corticosteróides e anti-inflamatórios sistêmicos, nos últimos quinze dias; bem como, gestação e amamentação.

#### 4.2.3 Variáveis mensuradas

Foram avaliadas as aplicações dos hidrogéis de BNC contendo ou não as frações de 20, 40 e 60% de gel total de *Aloe vera*. A escolha destas doses está amparada nos estudos pré-clínicos (GODINHO, 2016), uma vez que foi evidenciada maior eficácia e segurança nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Posteriormente foi avaliada a presença dos seguintes sinais e sintomas de reação alérgica:

- **Dor.** A dor foi avaliada pela Escala numérica de 1 a 10, sendo que zero significa ausência de dor e 10 dor intensa.

- **Eritema.** Este parâmetro foi avaliado aplicando-se leve pressão com a polpa digital sobre a área e liberando em seguida. As áreas de pele submetidas à pressão devem ficar esbranquiçadas após a remoção da mesma.

- **Ressecamento e descamação.** O local da aplicação foi avaliado pela palpação local e submetido à pequena fricção com a polpa digital.

- **Edema.** O edema foi avaliado pela prova de cacifo, que consiste na pressão da área com firmeza, utilizando-se o dedo polegar por 5 segundos, e posterior liberação. Outro método usado concomitantemente foi a mensuração da circunferência do antebraço com fita métrica, semanalmente. A fita foi posicionada na circunferência do antebraço a 3,0 cm da fossa cubital para verificar a medida do local ao longo do tratamento.

- **Calor.** A variação da temperatura da pele pode revelar processo inflamatório ou infeccioso pelo aumento do fluxo sanguíneo. O calor do local de aplicação foi avaliado com o dorso da mão da pesquisadora, comparando com a área corporal simetricamente oposta.

- **Prurido.** Para avaliação desta variável, foi considerada a informação fornecida pela pessoa voluntária quanto à presença ou não de prurido.

- **Vesículas ou bolhas.** Durante a inspeção visual do antebraço, foi identificada a presença ou não de vesículas.

#### 4.2.4 Produção e preparação das membranas de BNC

Para a produção das membranas de BNC com frações de gel total de *Aloe vera*, foram seguidos os protocolos padronizados e estabelecidos pelo Laboratório de tecnologias integradas/InteLAB. As membranas foram obtidas utilizando meio de cultura constituído de manitol, extrato de levedura e peptona, diluídos em 1 L de água

destilada. O pH foi ajustado para 6,5, em seguida a solução foi esterilizada. Foram adicionadas ao meio de cultura as proporções de 20, 40 e 60 % de uma solução de gel total de *Aloe vera* e posteriormente foi adicionado 10% (v/v) de inóculo obtido a partir de uma cultura reserva de *Gluconacetobacter hansenii* (ATCC 23769). O cultivo ocorreu em condições estáticas, à temperatura ambiente durante 10 dias em placas de 24 poços, onde cada poço recebeu 500 µl de meio de cultura inoculado. Após o período de cultivo, as membranas foram removidas e receberam um tratamento para eliminar as bactérias remanescentes, utilizando-se uma solução de NaOH 0,1 mol/L a 50°C por 24 horas, seguido de lavagens sucessivas com água destilada até o pH atingir a neutralidade (pH 7,0). Após a esterilização em autoclave, as membranas foram mantidas sob refrigeração até serem utilizadas para o ensaio clínico.

#### 4.2.5 Instrumento de coleta de dados

O instrumento de coleta de dados (Apêndice A) foi elaborado seguindo orientações contidas em documento reportado por Gomes (2009) e constituiu-se em um formulário elaborado para identificação do paciente voluntário e das condições de sua pele. Este formulário contém questões referentes às informações pessoais e ao seu perfil socioeconômico, características da pele (e registro fotográfico) antes e após aplicação do hidrogel e avaliação dos efeitos colaterais.

#### 4.2.6 Coleta de dados

Inicialmente, foi realizada a avaliação das pessoas voluntárias, onde os dados foram coletados e registrados no formulário. Posteriormente foi solicitado aos voluntários selecionados que lessem e, caso concordassem em participar da pesquisa, assinassem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B). Eles foram, então, encaminhados ao laboratório de análises clínicas (Laboratório de Análises Clínicas do Hospital da Universidade Federal de Santa Catarina) para coleta de material para exames. Foram solicitados exames laboratoriais no 1º e 30º dias após a aplicação dos hidrogéis.

Antes do início da aplicação tópica, foi realizada uma avaliação física para certificar se a pele da pessoa voluntária estava isenta de quaisquer sinais alérgicos, inflamatórios ou de infecção. Os grupos de tratamento foram divididos em indivíduos que receberiam as membranas BNC-controle, BNC-Aloe-20, BNC-Aloe-40 e BNC-Aloe-60. Com a finalidade de diminuir a probabilidade de dedução da membrana aplicada, os quatro hidrogéis foram subdivididos em quatro

recipientes semelhantes, totalizando quatro placas nomeadas de A a D (Figura 37).

Figura 37: Placas nomeadas (A, B, C e D) contendo os hidrogéis a serem aplicados.



Os indivíduos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. O hidrogel de BNC foi então aplicado (20, 40 e 60% da fração de gel total da *Aloe vera* ou BNC pura) no ante-braço direito, 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) durante 1 mês, em área circular correspondente a 4 cm<sup>2</sup> e posteriormente um filme de poliuretano foi colocado sobre o local, para que o hidrogel não fosse removido durante o banho, locomoção ou utilização de vestuário (Figura 38).

Figura 38: Esquema de aplicação dos hidrogéis nos voluntários com filme de poliuretano (Tegaderm®) usado para proteção da área aplicada.



Os participantes foram orientados que na ocorrência de reação inflamatória, alérgica ou lesão cutânea, a aplicação seria imediatamente interrompida e eles seriam encaminhados ao profissional médico participante do projeto.

#### 4.2.7 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (parecer número 483.389) (Apêndice C) e atende aos critérios da Resolução CNS 466/2012. A coleta de dados foi iniciada somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes do estudo.

#### 4.2.8 Análise estatística

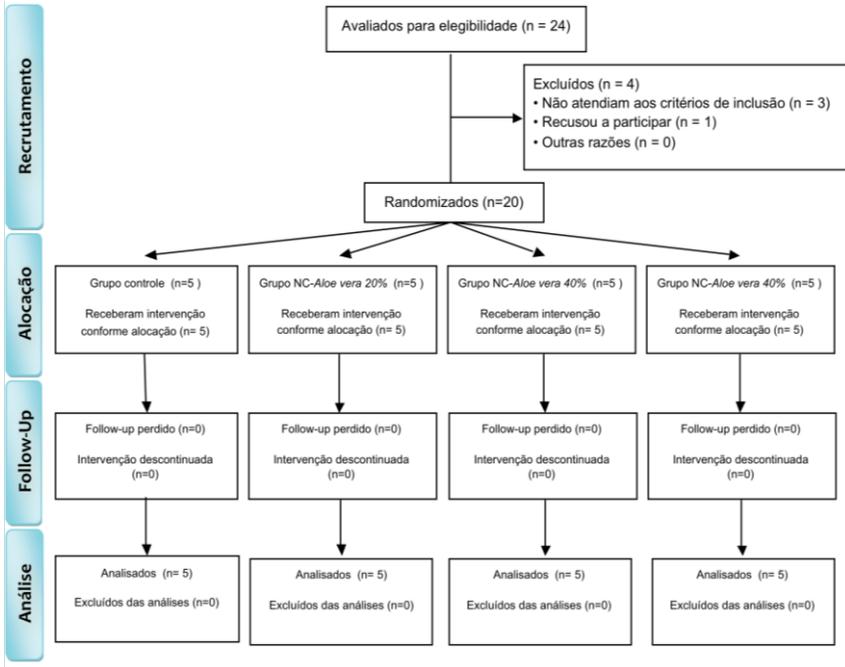
Para a análise das variáveis foi utilizado o software SPSS v.13.0. Para análise da frequência dos efeitos adversos entre os grupos, foi utilizado o teste Chi-quadrado. Para comparações entre controle e tratamentos, foi utilizado one-way ANOVA seguido do teste post-hoc de Tukey para as variáveis que atendiam ao critério de normalidade. Para as variáveis que violaram os critérios de validação da ANOVA, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado. Para analisar as diferenças apresentadas entre o primeiro dia e o último dia de aplicação dos hidrogéis, foi utilizado o teste t de Student. Para a análise das variáveis qualitativas da urinálise (cetonas, proteínas, substâncias reductoras, muco e flora) foi utilizado o teste Chi-quadrado para avaliação das diferenças entre grupos, e McNemar para analisar as diferenças entre o primeiro e último dia de tratamento. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p \leq 0.05$ .

---

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta etapa do estudo, buscou-se avaliar a segurança e eventuais efeitos adversos de hidrogéis de nanocelulose bacteriana compósitos com *Aloe vera* aplicados em indivíduos com pele íntegra. Para tanto os pacientes foram alocados aleatoriamente nos distintos grupos de tratamento como mostrado na Figura 39.

Figura 39: Fluxograma CONSORT mostrando o fluxo de pacientes no estudo.



A população alvo foi constituída de indivíduos hígidos, entre 18 e 50 anos, de ambos os sexos, que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa. A amostra foi composta por 20 pessoas voluntárias, cuja caracterização foi realizada a partir dos dados coletados nos formulários no momento da primeira avaliação e está descrita na Tabela 7:

Tabela 7: Dados demográficos

Dados demográfico		
Variáveis	n	%
<b>Idade (anos)</b>		
18-30	17	85
31-50	3	15
<b>Sexo</b>		
Masculino	12	60
Feminino	8	40
<b>Cor de pele</b>		
Branca	15	75
Não-branca	5	25

<b>Estado civil</b>		
Solteiro	16	80
Casado ou em união	2	10
Separado, divorciado ou viúvo	2	10
<b>Escolaridade</b>		
Ensino superior	10	50
Pós-graduação	10	50
<b>Tabagismo</b>		
Nunca	19	95
Ex-tabagista	0	
Sim	1	5
<b>Consumo de álcool – frequência</b>		
Nunca ou quase nunca	6	30
Pelo menos 1 vez por semana	13	65
Todo dia	1	5
<b>Problema de saúde atual</b>		
Não	18	90
Sim	2	10
<b>Internação hospitalar nos 12 meses antecedentes à entrevista</b>		
Não	20	100
Sim	0	0
<b>História pregressa de doença</b>		
Não	5	25
Sim	15	75
<b>Uso de medicamentos</b>		
Não	13	65
Sim	7	35
<b>História de pressão arterial elevada</b>		
Não	20	100
Sim	0	0
<b>Índice de massa corporal (IMC)</b>		
Baixo peso	1	5
Peso normal	15	75
Sobrepeso	4	20
Obeso	0	0
<b>Integridade da pele do antebraço</b>		
Não	0	0
Sim	20	100
<b>Grupo de tratamento</b>		
BNC-Aloe 20%	5	25
BNC-Aloe 40%	5	25
BNC-Aloe 60%	5	25
Controle	5	25

Do total da amostra, a média de idade foi 25,4 anos, sendo que a idade mínima encontrada foi 18 e a máxima 50 anos. Foram identificadas 2 pessoas com pele negra (10,0%), 3 pessoas de cor parda (15,0%) e o restante eram de cor branca (75,0%). Havia 9 pessoas (45,0%) alunos dos cursos de graduação, 1 (5,0%) com curso de graduação completo, 7 (35,0%) alunos com mestrado em curso e 3 (15,0%) com curso de mestrado completo. Quanto ao hábito de fumar, havia na amostra apenas uma pessoa fumante (5,0%), que consumia 10 cigarros por dia, com início há 10 anos.

Em relação ao consumo de álcool, 30,0% dos voluntários relataram que nunca ou quase nunca consomem álcool, 65,0% relataram consumo pelo menos 1 vez na semana e apenas 1 pessoa (5,0%) relatou consumo todos os dias. Os problemas de saúde existentes no momento da coleta de dados foram apenas dois relatos de gripe (10,0%) e nenhuma pessoa foi internada nos 12 meses que antecederam a coleta. A ocorrência de doenças pregressas foi freqüente (75,0%), sendo que as relatadas foram: sinusite, bronquite, asma, alergias (medicamentosa, alimentar, cosmética e outras) e trombose periférica. Dos medicamentos em uso, o mais citado foi anticoncepcional (oral ou injetável), seguido por Ritalina e Travatan. Em relação aos dados antropométricos, a média de peso obtida foi 65,63 Kg, sendo que a medida mínima foi 51,0 Kg e a máxima de 78,0 Kg. A média das alturas obtida foi 1,68 m, cujo menor valor foi 1,54 m e o maior foi 1,84 m.

A análise da frequência dos efeitos adversos reportados entre os grupos pode ser observada na tabela 8 (total de análises = 13):

Tabela 8: Análise da frequência dos efeitos adversos entre os grupos durante a aplicação dos hidrogéis.

Membrana	Indivíduos	ANÁLISE DAS VARIÁVEIS						
		Eritrema	Edema	Calor	Dermatite	Prurido	Lesão	Dor
controle (n=5)	1	0	0	0	0	1	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	2	0	0
BNC-Aloe- 20 (n=5)	1	0	0	0	0	1	0	0
	2	0	0	0	0	2	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	3	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0

<b>BNC-Aloe-40 (n=5)</b>	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	2	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	3	4	0
<b>BNC-Aloe-60 (n=5)</b>	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	1	0	0
	3	0	0	0	0	1	0	0
	4	0	0	0	0	2	0	0
	5	0	0	0	0	1	0	0

0= não houve relato ao longo das aplicações

1= houve 1 relato ao longo das aplicações

2= houveram 2 relatos ao longo das aplicações

3= houveram 3 relatos ao longo das aplicações

4= houveram 4 relatos ao longo das aplicações

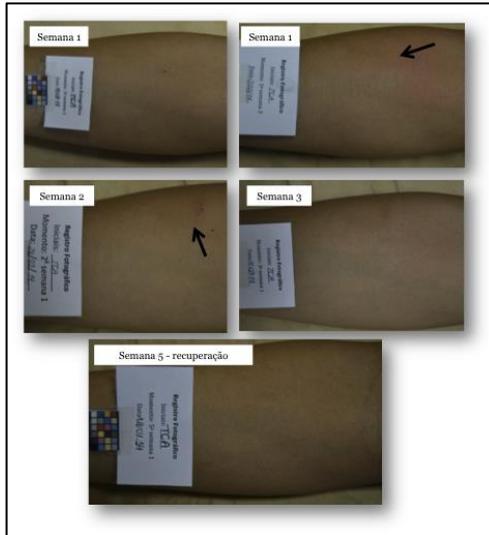
No decorrer do período de teste, nenhum dos voluntários desenvolveu reações adversas aos hidrogéis, que pudessem ser evidenciadas por eritema, edema, calor, dermatite, ou dor no local da aplicação. A Figura 40 representa a evolução normal típica dos pacientes após a aplicação dos hidrogéis.

Figura 40: Evolução normal da aplicação dos hidrogéis ao longo do teste. Em evidência: grupo BNC-Aloe-40



Entretanto, circunscrito ao local de aplicação do filme de poliuretano, observou-se que 11 pessoas da amostra (55,0%) desenvolveram sintomas iniciais de alergia, evidenciada por presença de prurido. Houve apenas um relato de lesão no local do curativo devido à fricção para aliviar a coceira. Esta situação foi contornada evitando-se ao máximo o contato direto do filme de poliuretano, até remissão dos sinais e sintomas como pode ser observado na Figura 41. No entanto, sabe-se que os curativos adesivos provocam alta incidência de dermatite eczematosa e formação de vesículas na pele. Desta forma, sugere-se que a irritação observada está relacionada com o filme de fixação em detrimento ao compósito de BNC e *Aloe vera*.

Figura 41: Evolução atípica com presença de sintomas iniciais de alergia em região circunscrita ao filme de poliuretano e posterior regressão dos sintomas. As setas pretas indicam as áreas afetadas (nas semanas 1 e 2).



Quanto aos exames laboratoriais realizados antes e após as aplicações, foram coletados materiais de 20 pessoas. Considerando o resultado dos hemogramas realizados antes do início das aplicações, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos que iriam receber as membranas de BNC-Aloe e o grupo controle. Os resultados dos exames bioquímicos de sangue e urina, antes do início das aplicações, também não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (para valores de referência, ver apêndice D).

Após o término das aplicações das membranas, todas as pessoas alocadas foram submetidas a novos exames de hemograma e bioquímicos de sangue e urina. Não houveram diferenças estatisticamente significativas nos hemogramas entre o grupo controle e os que receberam as membranas BNC-Aloe. Nos testes bioquímicos de sangue, apenas os valores de creatinina foram maiores no grupo tratado com BNC-Aloe-60 quando comparado aos obtidos no grupo controle ( $p = 0,028$ ). Entretanto, tais valores encontravam-se dentro dos parâmetros de normalidade, portanto não apresentam relevância clínica. Nos testes de urina realizados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Tais resultados estão apresentados na Tabela 9:

Tabela 9: Resultados das análises de hemograma, testes bioquímicos e urinálise de pessoas voluntárias sadias no início e no final das aplicações. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão; \*  $p \leq 0,05$  comparado ao respectivo controle; \*\*  $p \leq 0,05$  comparado ao valor inicial (antes da aplicação dos hidrogéis).

HEMOGRAMA	Controle (n=5)		BNC-Aloe-20 (n=5)		BNC-Aloe-40 (n=5)		BNC-Aloe-60 (n=5)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Hemácias (milhões/mm <sup>3</sup> )	494 $\pm$ 046	499 $\pm$ 053	484 $\pm$ 036	482 $\pm$ 041	467 $\pm$ 033	453 $\pm$ 042	441 $\pm$ 022	430 $\pm$ 016
Hemoglobina (g/dl)	1458 $\pm$ 157	1460 $\pm$ 146	1452 $\pm$ 103	1445 $\pm$ 118	1422 $\pm$ 126	1380 $\pm$ 149	1292 $\pm$ 088	1243 $\pm$ 038
Hematócrito (%)	4220 $\pm$ 360	4292 $\pm$ 342	4134 $\pm$ 324	4193 $\pm$ 356	4100 $\pm$ 289	4036 $\pm$ 353	3732 $\pm$ 204	3698 $\pm$ 088
VCM (ul.fl)	8630 $\pm$ 194	8875 $\pm$ 239**	8540 $\pm$ 190	8700 $\pm$ 094**	8772 $\pm$ 171	8910 $\pm$ 143**	8466 $\pm$ 155	7148 $\pm$ 2983
HCM (pg)	2978 $\pm$ 142	3008 $\pm$ 128	3002 $\pm$ 099	3003 $\pm$ 123	3038 $\pm$ 078	3042 $\pm$ 071	2928 $\pm$ 147	3013 $\pm$ 086
CHCM (g/dl)	3448 $\pm$ 099	3383 $\pm$ 079	3518 $\pm$ 117	3452 $\pm$ 132**	3464 $\pm$ 065	3412 $\pm$ 070**	3462 $\pm$ 140	2905 $\pm$ 1065
Global de leucócitos (p/mm <sup>3</sup> )	6920 $\pm$ 503	6740 $\pm$ 1194	74680 $\pm$ 20259	68950 $\pm$ 13618	7020 $\pm$ 16133	68580 $\pm$ 10665	55720 $\pm$ 19645	66350 $\pm$ 11865
Neutrófilos segmentados (%)	0 $\pm$ 8	0 $\pm$ 3	0 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 6	0 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 5
Neutrófilos bastonetes (%)	4102 $\pm$ 2502	5122 $\pm$ 770	5070 $\pm$ 1251	4945 $\pm$ 1096	4966 $\pm$ 506	4824 $\pm$ 295	4714 $\pm$ 687	5570 $\pm$ 773
Eosinófilos (%)	465 $\pm$ 1042	000 $\pm$ 000	000 $\pm$ 000	000 $\pm$ 000	020 $\pm$ 040	000 $\pm$ 000	000 $\pm$ 000	000 $\pm$ 000
Basófilos (%)	284 $\pm$ 341	328 $\pm$ 282	432 $\pm$ 320	360 $\pm$ 311	292 $\pm$ 097	354 $\pm$ 098**	340 $\pm$ 317	295 $\pm$ 289
Linfócitos (%)	056 $\pm$ 027	054 $\pm$ 022	052 $\pm$ 025	050 $\pm$ 023	042 $\pm$ 019	046 $\pm$ 019	038 $\pm$ 039	048 $\pm$ 049
Monócitos (%)	3416 $\pm$ 1053	3476 $\pm$ 677	3590 $\pm$ 1095	3798 $\pm$ 1025	3780 $\pm$ 341	3818 $\pm$ 242	3956 $\pm$ 930	3113 $\pm$ 879
	826 $\pm$ 234	1020 $\pm$ 195	856 $\pm$ 131	848 $\pm$ 186	840 $\pm$ 065	938 $\pm$ 054	932 $\pm$ 104	973 $\pm$ 123

Tabela 9: Resultados das análises de hemograma, testes bioquímicos e urinálise de pessoas voluntárias sadias no início e no final das aplicações. (Continuação)

	Controle (n=5)		BNC-Aloe-20 (n=5)		BNC-Aloe-40 (n=5)		BNC-Aloe-60 (n=5)							
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final						
Plaquetas (p/mm <sup>3</sup> )	2370 ± 00	2894 ± 305	2330 ± 000	3546 ± 830	2575 ± 000	7086 ± 788	2640 ± 000	6186 ± 631	25040 ± 000	4938 ± 605	22780 ± 000	5942 ± 811	24075 ± 000	7195 ± 543
<b>TESTES</b>														
<b>BIOQUÍMICOS</b>														
Glicemia de jejum (mg/dl)	8580 ± 1376	817 ± 078	8840 ± 1358	1001 ± 104	8520 ± 1424	8520 ± 081	642 ± 1384	378 ± 080	8340 ± 496	8400 ± 105	8380 ± 460	8525 ± 699		
Tempo de protrombina	2904 ± 376	025 ± 025	2948 ± 396	036* ± *	2858 ± 398	240 ± 037	1384 ± 398	080 ± 025	1416 ± 026	1398 ± 036	1405 ± 028	1385 ± 403	2850 ± 028	
Tempo de trombotestina	726 ± 2280	080 ± 756	744 ± 2100	043 ± 245	724 ± 1940	021 ± 339	712 ± 2720	027 ± 1450	748 ± 034	720 ± 032	752 ± 065	750 ± 062		
Albumina sérica (g/dl)	2860 ± 3820	740 ± 1462	2760 ± 3940	434 ± 1629	2640 ± 2880	907 ± 593	3540 ± 2740	2301 ± 688	2620 ± 3000	426 ± 566	2740 ± 3060	924 ± 1024	2300 ± 2475	744 ± 618
Fosfatase alcalina (U/l)	8380 ± 3405	8620 ± 3292	8620 ± 3292	7400 ± 949	7400 ± 869	7300 ± 949	7300 ± 869	6980 ± 1070	7780 ± 1636	7525 ± 2061				

331\*  
\*

Tabela 9: Resultados das análises de hemograma, testes bioquímicos e urinálise de pessoas voluntárias sadias no início e no final das aplicações. (Continuação)

	Controle (n=5)		BNC-Aloe-20 (n=5)		BNC-Aloe-40 (n=5)		BNC-Aloe-60 (n=5)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Ureia(mg/dl)	2800 ± 628	3160 ± 862	2500 ± 515	2260 ± 385	2680 ± 483	2560 ± 287	2820 ± 559	2625 ± 741
Creatinina(mg/dl)	088 ± 011	088 ± 013	082 ± 024	078 ± 019	080 ± 013	072 ± 010	074 ± 017	060 ± 008*
Bilirrubina total (mg/dl)	078 ± 053	118 ± 112	084 ± 027	074 ± 029	104 ± 065	104 ± 078	098 ± 062	073 ± 026
Cálcio(mg/dl)	882 ± 047	854 ± 027	905 ± 011	850 ± 049	896 ± 029	842 ± 044	886 ± 036	837 ± 021*
Fósforo(mg/dl)	388 ± 025	376 ± 043	320 ± 055	348 ± 038	398 ± 025	388 ± 033	372 ± 024	408 ± 034
Cloratos(mEq/l)	10180 ± 179	10060 ± 230	9900 ± 173	10080 ± 084	10060 ± 136	10180 ± 117**	10120 ± 110	10200 ± 141
Sódio(mEq/l)	13740 ± 261	13680 ± 110	13440 ± 288	13700 ± 158	13460 ± 136	13740 ± 136**	13720 ± 110	13850 ± 058
Potássio(mEq/l)	410 ± 029	398 ± 015	376 ± 022	402 ± 019	410 ± 018	382 ± 016**	402 ± 043	410 ± 024
<b>URNÁLISE</b>								
pH	600 ± 087	640 ± 065	570 ± 067	563 ± 025	590 ± 020	600 ± 055	580 ± 057	588 ± 025
Densidade	10176 ± 899	10190 ± 1084	10236 ± 279	10225 ± 1190	10234 ± 441	10180 ± 927	10198 ± 402	10262 ± 250**
Hemácias (ml)	58000 ± 45497	48000 ± 44384	48000 ± 79498	50000 ± 34641	38000 ± 18330	28000 ± 17204	12200 ± 11987	18250 ± 31191
Leucócitos (ml)	0 ± 3	0 ± 7	0 ± 4	0 ± 0	0 ± 3	0 ± 7	0 ± 49	0 ± 61
	20000 ± 17320	42000 ± 38340	32800 ± 69132	10750 ± 84212	26000 ± 12000	32000 ± 24000	52000 ± 35637	50000 ± 24994
	0 ± 5	0 ± 6	00 ± 30	00 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 1	0 ± 9

Ao comparar os exames (hemograma, perfil bioquímico e urinálise) antes e após a aplicação dos hidrogéis percebeu-se que alguns grupos apresentaram discreta diferença, não significativa, nos resultados, porém ainda estavam compreendidos no intervalo de normalidade. Os valores de VCM apresentaram-se ligeiramente aumentados nos grupos BNC-Aloe-20 ( $p=0,001$ ), BNC-Aloe-40 ( $p=0,003$ ) e BNC-controle ( $p=0,013$ ) ao final das aplicações. Os eosinófilos também apresentaram-se ligeiramente aumentados no grupo BNC-Aloe-40 ( $p=0,040$ ) e os valores de CHCM apresentaram-se ligeiramente diminuídos no grupo BNC-Aloe-20 ( $p=0,002$ ) e BNC-Aloe-40 ( $p=0,003$ ). Considerando os resultados de urinálise, observou-se um leve aumento na densidade, apresentada apenas no grupo BNC-Aloe-60 ( $p=0,021$ ) porém tais quais as diferenças apresentadas acima, estas estavam compreendidas no intervalo de normalidade e não representavam relevância clínica.

---

#### 4.4 CONCLUSÕES

Os ensaios clínicos de fase I são a primeira etapa de avaliação da aplicação de um produto em seres humanos. No teste de segurança e inocuidade dos compósitos de nanocelulose bacteriana com *Aloe vera* aplicados em pele de pessoas saudáveis, observou-se que nenhuma das pessoas voluntárias desenvolveu qualquer sinal e sintoma de alergia ao produto. A pele no local de aplicação manteve-se íntegra, sem a presença de eritema, ressecamento, calor, bolhas, relatos de dor ou prurido. As diferenças estatisticamente significativas encontradas entre os grupos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos não têm relevância clínica pois estão compreendidas nos intervalos de normalidade. Diante do exposto, não houveram evidências clínicas de toxicidade dos compósitos de nanocelulose bacteriana com *Aloe vera*. Desta forma, conclui-se que o biomaterial desenvolvido é seguro para aplicação em humanos.

O protocolo desenvolvido e testado neste estudo constitui-se em uma ferramenta útil e aplicável em futuros testes de avaliação da segurança de aplicação tópica de membranas de BNC modificadas. Apesar dos resultados clínicos aqui apresentados serem referentes à aplicação da membrana BNC-Aloe, acredita-se que tal protocolo seja adequado para avaliação de qualquer outra formulação da membrana de BNC, que tenha como finalidade a sua aplicação tópica.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; ET AL. Molecular Biology of the Cell. Integrins. 4th edition. Garland Science, 2002.

ÁVILA, H. M.; FELDMANN, E.; PLEUMEEKERS, M. M.; NIMESKERN, L.; KUO, W.; DE JONG, W. C.; SCHWARZ, S.; MÜLLER, R.; HENDRIKS, J.; ROTTER, N.; VAN OSCH, G. J. V. M.; STOK, K. S.; GATENHOLM, P. Novel bilayer bacterial nanocellulose scaffold supports neocartilage formation in vitro and in vivo. *Biomaterials*, v. 44, p. 122–133, 2015.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)*, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.

BARROS, S. B.; MARIA-ENGLER, S. S. Artificial skin in perspective: concepts and applications. *Pigment Cell Melanoma Res*, v. 24, n. 1, p. 35-50, 2011.

BARUA, S.; MITRAGOTRI, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects. *Nano Today*, v. 9, p. 223–243, 2014.

BAUMANN, L. *Dermatologia cosmética: princípios e prática*. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. 238 p.

BAZRAFSHAN, R.; SEYEDHOSSEIN, H.; JEBALI, A. Nanocellulose conjugated with polylysine and polyarginine: Their antimicrobial activity and toxicity, v. 6, n. 1, p. 29-40, 2015.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, v. 2, p. 403-430, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Brasília, 1997, 20 pg.

BRASIL. Resolução CNS No 466, de 12 de dezembro de 2012.

BROHEM, C. A.; CARDEAL, L. B.; TIAGO, M.; SOENGAS, M. S.; BURKE, J. F.; YANNAS, I. V.; QUINBY, W. C.; JR., BONDOC, C. C.; JUNG, W. K. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, v. 194, n. 4, p. 413-428, 1981.

CAI, L.; LU, J.; SHEEN, V.; WANG, S. Optimal Poly (L-lysine) Grafting Density in Hydrogels for Promoting. *Neural Progenitor Cell Functions*, 2012.

CERQUEIRA, M. T.; DA SILVA, L. P.; SANTOS, T. C.; PIRRACO, R.P.; CORRELO, V. M.; MARQUES, A. P.; REIS R. L. Human Skin Cell Fractions Fail to Self-Organize Within a Gellan Gum/Hyaluronic Acid Matrix but Positively Influence Early Wound Healing. *Tissue Engineering Part A.*, v. 20(9-10), p.1369-1378, 2014.

CHANG, C. Y.; ZHANG, L. N. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, n. 1, p. 40-53, 2011.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B. E., CHANDRAKASAN, G. Influence of Aloe vera on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 181, n. 1-2, p. 71-76, 1998.

CULEBRAS, M.; GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; TRONCOSO, O. P.; GOMEZ, C. M.; BAÑÓ, M. C. Optimization of Cell Growth on Bacterial Cellulose by Adsorption of Collagen and Poly-L-Lysine. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, v. 64, n. 8, 2015.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. "The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications". *Biomacromolecules*, v. 8, n. 1. p. 1-12, 2007.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWNJR, R. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

DINI, V.; BERTONE, M.; ROMANELLI, M. Prevention and management of pressure ulcers. *Dermatologic Therapy*, v. 19, n. 6, p. 356-364, 2006.

DÓRIA, J. G.. Efeito neuroprotetor dos moduladores alostéricos positivos do receptor metabotrópico de glutamato 5 na Doença de Huntington. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

DOUGHTY, D. B.; SPARKS-DEFRIESE, B. Wound-healing physiology. In: *Acute and chronic wounds: current management concepts*. St. Louis: Mosby Elsevier, v. 674, n. 4, p. 56-81, 2007.

EMA, Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais, Unidade de Avaliação de Medicamentos Humanos, 1997.

EMING, S. A.; SMOLA, H.; KRIEG, T. Treatment of chronic wounds: state of the art and future concepts. *Cells Tissues Organs*, v. 172, n. 2, p. 105-117, 2002.

FERRAZ, F.B. ; FERNANDEZ, J.F. Integrinas na adesão, migração e sinalização celular: associação com patologias e estudos clínicos. *Revista Científica da FMC*, v. 9, n. 2, 2014.

FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O.; ISAAC, C.; NETO, N. T.; SANTOS, G. B.; SUBSTITUTOS CUTÂNEOS: CONCEITOS ATUAIS E PROPOSTA DE CLASSIFICAÇÃO. *Rev. Bras. Cir. Plást.*, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.

FOHN, M. E.; BANNASCH, H. Artificial skin. *Methods Mol Med*, v. 140, p. 167-182, 2007.

FONTANA, J. D.; DE SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DE SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 24-25, p. 253-264, 1990.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr Polym*, v. 92, n. 2, p. 1432-1442, 2013.

FU, L.; ZHOU, P.; ZHANG, S.; YANG, G. Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large area skin transplantation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, v. 33, n. 5, p. 2995-3000, 2013.

FÜRSATZ, M.; SKOG, M.; SIVLÉR, P.; PALM, E.; ARONSSON, C.; SKALLBERG, A.; GRECZYNSKI, G.; KHALAF, H.; BENGTSSON, T.; AILI, D. Functionalization of bacterial cellulose wound dressings with the antimicrobial peptide  $\epsilon$ -poly-L-Lysine. *Biomed*, p. 1-29, 2017.

GAO, C.; WAN, Y.; LEI, X. Polylysine coated bacterial cellulose nanofibers as novel templates for bone-like apatite deposition. *Cellulose*, v. 18, n. 1555, 2011.

GENTZKOW, G. D.; IWASAKI, S. D.; HERSHON, K. S.; MENGEL, M.; PRENDERGAST, J. J.; RICOTTA, J. J.; STEED, D. P.; LIPKIN, S. Use of dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*, v. 19, n. 4, p.350-354, 1996.

GODINHO, J. F. Hidrogéis de Celulose Bacteriana Incorporados com Frações de Aloe vera. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

GODINHO, J. F.; BERTI, F. V.; MÜLLER, D.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Incorporation of Aloe vera extracts into nanocellulose during biosynthesis. *Cellulose*, v. 23, n. 1, p. 545–555, 2015.

GOMES, F.S.L. Efeito da fração proteolítica de *Carica candamarsensis* na cicatrização cutânea: avaliação pré-clínica e clínica fase I. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

GRIFFITH, L. G. Tissue Engineering--Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*, v. 295, n. 5557, p. 1009-1014, 2002.

GRINDLAY, D. E.; REYNOLDS, T. The Aloe-Vera Phenomenon - a Review of the Properties and Modern Uses of the Leaf Parenchyma Gel. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 16, n. 2-3, p. 117-151, 1986.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature*, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A.; NANMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 76A, n. 2, p. 431-438, 2006.

HIRAKI, J. T.; ICHIKAWA, S.; NINOMIYA, H.; SEKI, K.; UOHAMA, H.; SEKI, S.; KIMURA, Y.; YANAGIMOTO, J. W.; BARNETT, JR. Use of ADME studies to confirm the safety of  $\epsilon$ -polylysine as a preservative in food. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, v. 37, p. 328-334, 2003.

HORCH, R. E.; KNESER, U.; POLYKANDRIOTIS, E.; SCHMIDT, V. J.; SUN, J. M.; ARKUDAS, A. Tissue engineering and regenerative medicine -where do we stand? *J Cell Mol Med*, v. 16, n. 6, p.1157-1165, 2012.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*, v. 3, n. 10, p. 589-601, 2006.

ISO International Organization for Standardization, "Biological Evaluation of Medical Devices Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity," Iso 10993-5., vol. 5, pp. 1 – 52, 2009.

JORDAN, C. E., FREY, B.L., KORNGUTH S., CORN, R.M.. Characterization of Poly-L-lysine Adsorption onto Alkanethiol-Modified Gold Surfaces with Polarization-Modulation Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance Measurements. *Langmuir*, v. 10, p. 3642-3648, 1994.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. *Pele e Anexos*. Histologia Básica, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 2004. p. 359-370.

KESKIN, Z.; URKMEZ, A. S.; HAMES, E. E. Novel keratin modified bacterial cellulose nanocomposite production and characterization for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, v. 75, p. 1144–1153, 2017.

KHALILI, A. A.; AHMAD, M. R. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *Int J Mol Sci*, v. 8, n. 8, p. 18149–18184, 2015.

KIM, G.; KIM, W. Highly porous 3D nanofiber scaffold using an electrospinning technique. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, v. 81, n.1, p. 104-110, 2007.

KIM, H. -J.; ISHII, T.; ZHENG M.; WATANABE S.; TOH K.; MATSUMOTO Y.; NISHIYAMA N.; MIYATA K.; KATAOKA K. Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv. Transl.* v. 4 (1), p. 50-60, 2014.

KIM, J.; CAI, Z.; LEE, H.; CHOI, G.; LEE, D.; JO, C. Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. *J Polym Res*, v. 18, n. 4, p. 739, 2011.

KONDO, T.; TOGAWA, E.; BROWN, R. M. JR. "Nematic ordered cellulose": a concept of glucan chain association. *Biomacromolecules*, v. 2, n. 4, p. 1324-1330, 2001.

KWON, S. S.; KIM, S. Y.; KONG, B. J.; KIM, K. J.; NOH, J.Y.; IM, N.R.; LIM, J.W.; HÁ, J.H.; KIM, J.; PARK, S.N. Cell penetrating peptide conjugated liposomes as transdermal delivery system of *Polygonum aviculare* L. extract. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 483, p. 26–37, 2015.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. *Science*, v. 260, n. 5110, p. 920-926, 1993.

LEVIN, M. P.; TSAKNIS, P. J.; CUTRIGHT, D. E. Healing of the oral mucosa with the use of collagen artificial skin. *J Periodontol*, v. 50, n. 5, p. 250-3, 1979.

LI, Y.; WANG, S.; HUANG, R.; HUANG, Z.; HU B.; ZHENG, W.; YANG, G.; JIANG, X. Evaluation of the effect of the structure of bacterial cellulose on full thickness skin wound repair on a microfluidic chip. *Biomacromolecules*, 2015.

LIN, L.; PERETS, A.; HAR-EL, Y.; VARMA, D.; LI, M.; LAZAROVICI, P.; WOERDEMAN, D L.; LELKES, P. I. Alimentary 'green' proteins as electrospun scaffolds for skin regenerative

engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, v.7, p. 994–1008, 2013.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Synthesis and characterization of nanocellulose reinforced full-interpenetrating polymer network based on poly(vinyl alcohol) and polyacrylamide (both crosslinked) composite films. *Polym Compos*, v. 38, p.1720–1731, 2017.

MARTSON, M.; VILJANTO, J.; LAIPPALA, P.; SAUKKO, P. Connective tissue formation in subcutaneous cellulose sponge implants in the rat. The effect of the size and cellulose content of the implant. *European Surgical Research*, v. 30, n. 6, p. 419-425, 1998.

MÜLLER, F. A.; MÜLLER, L.; HOFMANN, I.; GREIL, P.; WENZEL, M. M.; STAUDENMAIER, R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, n. 21, p. 3955-3963, 2006.

NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: Critical Issues in Tissue Engineering: Biomaterials, Cell Sources, Angiogenesis, and Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 26, n. 4, p. 383-417, 2011a.

NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J Biomater Appl*, v. 26, n. 4, p. 383-417, 2011b.

NASCIMENTO, M. H. M.; & LOMBELLO, C. B. Hyaluronic acid and chitosan based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Polímeros*, vol.26 no.4 São Carlos, 2016.

OPAS Organização pan-americana da saúde –Fundação Nacional de Saúde. Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis. 1ed. Brasília: FNS, 1997.

PAES, C.; NAKAGAMI, G.; MINEMATSU, T.; NAGASE, T.; HUANG, L.; SARI, Y.; SANADA, H. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone enhances keratinocyte migration and induces Mmp13 gene expression in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 427, p. 273–279, 2012.

PARADKAR, M., IRUDAYARAJ, J. Determination of cholesterol in dairy products using infrared techniques: FTIR spectroscopy. *Int Dairy Technol.*v. 55: 127–132, 2002.

PEIXOTO, R. S.; SANTOS, D. L. N. Biofill: uso e avaliação clínica de uma película celulósica em lesões cutâneas. *Rev Bras Cir*, v. 78, n. 2, p. 141-145, 1988.

PEREIRA, M. M. et al Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers. *Nanotechnology*, v. 24(7), 2013.

PERTILE, R. A. N.; ANDRADE, F. K.; ALVES, JR. C.; GAMA, M. Surface modification of arterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 3, p. 692–698, 2010.

PÉRTILE, R.; MOREIRA, S.; ANDRADE, F. K.; DOMINGUES, L.; GAMA, M. Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. *Biotechnol Prog*, v. 28, n. 2, p. 526-532, 2012.

PITANGUY, I.; SALGADO, F.; MARACAJÁ, P. F. Utilização de película de celulose (Biofill) como curativo biológico. *Rev Bras Cir*, v. 78, n. 5, p. 317-326, 1988.

PRIYA, S. G.; JUNGVID, H.; KUMAR, A. Skin Tissue Engineering for Tissue Repair and Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 14, n. 1, p. 105-118, 2008.

RAJASEKARAN, S.; RAVI, K.; SIVAGNANAM, K. E.; SUBRAMANIAN, S. Beneficial effects of Aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 33, n. 3, p. 232-237, 2006.

RECOUVREUX, D. O. S.; RAMBO, C. R.; BERTI, F. V.; CARMINATTI, C. A.; ANTÔNIO, R. V.; PORTO, L. M. Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 2, p.151-157, 2011.

RIPPA, A. L.; VOROTELYAK, E. A.; VASILIEV, A.V.; TERSKIKH, V. V. The Role of Integrins in the Development and Homeostasis of the Epidermis and Skin Appendages. *Acta Naturae*, v. 5, n. 4, p. 22–33, 2013.

SAIBUATONG, O.-A.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera–bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 2, p. 455-460, 2010.

SHAKESPEARE, P. G. The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries. *Clin Dermatol*, v. 23, n. 4, p. 413-418, 2005.

SHAO, W., WU, J., LIU, H., YE, S., JIANG, L., LIU, X., Novel Bioactive Surface Functionalization of Bacterial Cellulose. Membrane. *Carbohydrate Polymers*. v. 09, 2017.

SOUZA, G. V. DE. Avaliação da Viabilidade e da Interação de Neurônios do Gânglio da Raiz Dorsal em Hidrogéis de Celulose Bacteriana . Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina 2011.

SOUZA, S. S. DE. Bionanocellulose: new methods for biofilm production and high-quality bacterial rna extraction. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*, v. 52, p. 443-451, 2001.

STUMPF, T. R.; PÉRTILE, R. A. N.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M. Enriched glucose and dextrin mannitol-based media modulates fibroblast behavior on bacterial cellulose membranes. *Materials Science and Engineering: C*, v. 33, n. 8, p. 4739–4745, 2013.

STUMPF, T. R.; YANG, X.; ZHANG, J.; CAO, X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. v. 82, p. 372–383, 2018.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBURG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial

cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.

SZULGIT, G.; RUDOLPH, R.; WANDEL, A.; TENENHAUS, M.; PANOS, R.; GARDNER, H. Alterations in Fibroblast  $\alpha 1\beta 1$  Integrin Collagen Receptor Expression in Keloids and Hypertrophic Scars. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 118 (3), p. 409-415, 2002.

TAKZARE, N.; HOSSEINI, M.; HASANZADEH, G.; MORTAZAVI, H.; TAKZARE, A. E.; HABIBI, P. Influence of Aloe Vera Gel on Dermal Wound Healing Process in Rat. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 19, n. 1, p. 73-77, 2009.

TREPAT, X.; CHEN, Z.; JACOBSON, K. Cell Migration. *Comprehensive Physiology*. v. 2(4), p. 2369-2392. 2012

TSAO, C.T., LEUNG, M., CHANG, J. Y.F. AND ZHANG M. A simple material model to generate epidermal and dermal layers in vitro for skin regeneration. *J Mater Chem B Mater Biol Med*, 2(32): 5256–5264, 2014.

TYLER, V. E. A history of pharmacy: future opportunities. *Pharm Hist*, v. 35, n. 4, p. 163-168, 1993.

VILLARINO, N.; LANDONI, M. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. *Analecta Veterinaria*, v. 26, n. 1, p. 28-37, 2006.

WATANABE, M.; KONDO, S. Changing clothes easily: connexin41.8 regulates skin pattern variation. *Pigment Cell Melanoma Res*, v. 25, n. 3, p. 326-330, 2012.

WEI, Y. Chitosan/silk fibroin-based tissue-engineered graft seeded with adipose-derived stem cells enhances nerve regeneration in a rat model. *J Mater Sci-Mater M*, v. 22, n. 8, p. 1947-1964, 2011.

WHO. World Health Organization monographs on selected medicinal plants. Geneva: World Health Organization, 289, 1999

WONG, V. W.; GURTNER, G. C. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. *Exp Dermatol*, v. 21, n. 10, p. 729-734, 2012.

ZANG, S.; ZHUO, Q.; CHANG, X.; QIU, G.; WU, Z.; YANG, G. Study of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (HASCs) on bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*. v.104, p. 158–165, 2014.

ZAULYANOV, R. S. K. E. L. A review of a bi-layered living cell treatment (Apligraf®) in the treatment of venous leg ulcers and diabetic foot ulcers. *Clinical Interventions in Aging*, v. 2, p. 93-98, 2007.

ZHONG, S. P.; ZHANG, Y. Z.; LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 2, n. 5, p. 510-525, 2010.

ZHU, C.; LI, F.; ZHOU, X.; LIN, L.; ZHANG, T. 2013. Kombucha-synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization and biocompatibility evaluation. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013

ZIMMERMANN, K. A.; LEBLANC, J. M.; SHEETS, K. T.; FOX, R. W.; GATENHOLM, P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 1, p. 43–49, 2011



## 6. APÊNDICES

### APÊNDICE A

<b>INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS TESTE CLÍNICO FASE I</b>	
<b>1. DADOS DEMOGRÁFICOS</b>	
Data da avaliação: ____/____/____	Código de identificação:
1 Nome completo:	
2 Endereço completo:	
Bairro:	Cidade:
UF:	CEP:
Telefone: ( )	
3 Data de nascimento: ____/____/____	
4 Idade (anos completos):	
5 Sexo: <input type="checkbox"/> 1. Masculino <input type="checkbox"/> 2. Feminino	
6 Naturalidade (UF):	
7 Cor (observação do entrevistador):	
<input type="checkbox"/> 1. Branca	<input type="checkbox"/> 2. Parda / mulata / morena / cabocla
<input type="checkbox"/> 3. Negra	<input type="checkbox"/> 4. Indígena
<input type="checkbox"/> 5. Amarela/oriental	
<b>2. SITUAÇÃO CONJUGAL</b>	
1 Qual o seu estado civil atual?	
<input type="checkbox"/> 1. Solteiro	<input type="checkbox"/> 2. Casado
<input type="checkbox"/> 3. Em união	<input type="checkbox"/> 4. Separado ou divorciado
<input type="checkbox"/> 5. Viúvo	
<b>3. ESCOLARIDADE</b>	
1 Qual sua escolaridade?	
<input type="checkbox"/> 1. Ensino fundamental incompleto <input type="checkbox"/> 2. Ensino fundamental	

		completo	
<input type="checkbox"/> 3. Ensino médio incompleto		<input type="checkbox"/> 4. Ensino médio completo	
<input type="checkbox"/> 5. Ensino superior incompleto		<input type="checkbox"/> 6. Ensino superior completo	
<input type="checkbox"/> 7. Especialização incompleta		<input type="checkbox"/> 8. Especialização completa	
<input type="checkbox"/> 9. Mestrado incompleto		<input type="checkbox"/> 10. Mestrado completo	
<input type="checkbox"/> 11. Doutorado incompleto		<input type="checkbox"/> 12. Doutorado completo	
<b>4. FUMO</b>			
1 Você fuma atualmente?			
<input type="checkbox"/> 1. Não → <b>sig 5</b>		<input type="checkbox"/> 2. Sim	
<input type="checkbox"/> 3. Ex-fumante → <b>sig 5</b>			
2 Quantos cigarros fuma por dia?			
3 Há quanto tempo você fuma?			
4 Sempre fumou a mesma quantidade?			
<input type="checkbox"/> 1. Não		<input type="checkbox"/> 2. Sim	<input type="checkbox"/> 3. Sem dado
<input type="checkbox"/> 4. NA			
5 Há quanto tempo que parou de fumar?			
6 Quantos cigarros fumava por dia?			
7 Durante quanto tempo você fumou?			
<b>5. FREQUÊNCIA DE CONSUMO DE ÁLCOOL</b>			
		FREQUÊNCIA	
		Todo dia	Pelo menos 1 vez por semana
		Nunca ou quase nunca	
BEBIDA	QUANTIDADE		
Cachaça			
Cerveja			
Vinho			

Whisky		
Outras:		
<b>6. HISTÓRIA OBSTÉTRICA</b>		
1 Você está grávida atualmente?		
<input type="checkbox"/> 1. Não	<input type="checkbox"/> 2. Sim	<input type="checkbox"/> 3. NA → <b>sigla VII</b>
2 Você está em período de amamentação?		
<input type="checkbox"/> 1. Não	<input type="checkbox"/> 2. Sim	
<b>7. MORBIDADE</b>		
1 Você está atualmente com algum problema de saúde?		
<input type="checkbox"/> 1. Não	<input type="checkbox"/> 2. Sim	
2 Qual?		
3 Você foi internado por algum problema de saúde nos últimos 12 meses?		
<input type="checkbox"/> 1. Não	<input type="checkbox"/> 2. Sim	
4 Qual?		
5 Algum médico já lhe disse que você teve alguma dessas doenças?		
<input type="checkbox"/> 1. Hipertensão arterial	<input type="checkbox"/> 2. Diabetes mellitus	
<input type="checkbox"/> 3. Lúpus eritematoso	<input type="checkbox"/> 4. Insuficiência renal	
<input type="checkbox"/> 5. Insuficiência cardíaca	<input type="checkbox"/> 6. AIDS	
<input type="checkbox"/> 7. Infarto do miocárdio	<input type="checkbox"/> 8. Esquistossomose	
<input type="checkbox"/> 9. Doença de Chagas	<input type="checkbox"/> 10. Sífilis	
<input type="checkbox"/> 11. Cisticercose	<input type="checkbox"/> 12. Estrongilóide	
<input type="checkbox"/> 13. Malária	<input type="checkbox"/> 14. Angina	
<input type="checkbox"/> 15. Câncer	<input type="checkbox"/> 16. Febre reumática	
<input type="checkbox"/> 17. Trombose periférica	<input type="checkbox"/> 18. Embolia pulmonar	
<input type="checkbox"/> 19. Tuberculose	<input type="checkbox"/> 20. Meningite	
<input type="checkbox"/> 21. Doença hepática (cirrose, hepatite)		
<input type="checkbox"/> 22. Outras/alergias:		
_____		
_____		
6 Você faz uso de algum medicamento?		
<input type="checkbox"/> 1. Não	<input type="checkbox"/> 2. Sim	<input type="checkbox"/> 3. Não sabe
7 Qual?		

8 Alguma vez, um profissional da saúde já aferiu sua pressão arterial?		
[ ] 1. Não                      [ ] 2. Sim                                      [ ] 3. Não sabe		
9 Alguma vez, você foi diagnosticado com pressão arterial alta?		
[ ] 1. Não                      [ ] 2. Sim                                      [ ] 3. Não sabe		
<b>8. ANTROPOMETRIA</b>		
1 Peso medido (kg)		
2 Estatura (m)		
<b>9. EXAMES LABORATORIAIS</b>		
Resultados de:	1º dia	30º dia
Hemograma:		
Hemácias		
Hemoglobina		
Hematócrito		
VCM		
HCM		
CHCM		
Global de leucócitos		
Neutrófilos segmentados		
Neutrófilos bastonetes		
Eosinófilos		
Basófilos		
Linfócitos		
Monócitos		
Plaquetas		
Glicemia jejum		
Tempo de coagulação		
Tempo de protrombina		
Tempo de tromboplastina		
Albumina sérica		
Proteínas totais		
TGO		
TGP		
Gama GT		





<b>11. REGISTRO FOTOGRÁFICO</b>		
<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 1ª semana 1 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 1ª semana 2 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 1ª semana 3 Data: __/__/____
<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 2ª semana 1 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 2ª semana 2 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 2ª semana 3 Data: __/__/____
<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 3ª semana 1 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 3ª semana 2 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 3ª semana 3 Data: __/__/____
<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 4ª semana 1 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 4ª semana 2 Data: __/__/____	<b>Registro Fotográfico</b> Iniciais: _____ Momento: 4ª semana 3 Data: __/__/____



## APÊNDICE B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

#### TÍTULO DO ESTUDO: ESTUDO CLÍNICO DE FASE I DA AÇÃO CICATRIZANTE DE MEMBRANAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA COMPÓSITAS COM *ALOE VERA*

Pesquisador responsável: Camila Quinetti Paes

#### INFORMAÇÕES GERAIS

Este estudo clínico de fase I está sendo realizado para avaliar um novo tratamento de feridas de pele, desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC. A substância em teste é uma membrana temporária potencializadora da cicatrização, formada por um hidrogel de nanocelulose bacteriana compósito com frações de *Aloe vera* (babosa). Trata-se de um estudo duplo cego randomizado de fase I.

Você foi convidado(a) a participar deste estudo clínico de forma voluntária, podendo sair da pesquisa a qualquer momento. Você não terá qualquer gasto e não receberá pagamento para participar. A sua identidade será mantida em sigilo. Os resultados serão apresentados em grupo e não individualmente, sem incluir os nomes dos participantes. Dessa forma você não será identificado quando os resultados forem utilizados, seja para propósitos de publicação científica ou educativa.

O estudo terá duração de 1 mês. A primeira etapa será a aplicação do hidrogel de nanocelulose bacteriana compósito com frações de *Aloe vera* na pele íntegra de pessoas saudáveis, para verificar sua segurança (como a pele reage a esta substância).

O presente estudo atende aos critérios da Resolução CNS 466/12 e foi desenhado segundo os princípios éticos da pesquisa em seres humanos.

#### PROCEDIMENTO

Caso você concorde em participar deste estudo, lhe será solicitado que responda à entrevista e colha amostras de sangue e urina. Sua pele do antebraço esquerdo será examinada antes, durante e após todo o processo. Seu estado de saúde será avaliado pelo exame físico, pelos exames laboratoriais e por suas respostas colhidas pela pesquisadora.

As amostras de sangue serão coletadas utilizando agulhas e seringas descartáveis, por profissional técnico responsável, da empresa a qual você será encaminhado. A urina será coletada por você, após instruções de como realizá-la, que deverá ser entregue no dia e local da coleta de sangue.

Uma amostra do hidrogel de nanocelulose bacteriana compósito com *Aloe vera* será aplicado 3 vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira), durante 1 mês, no seu antebraço direito, em área circular correspondente a 4 cm<sup>2</sup> e protegido com um filme transparente, impermeável a água, microrganismos e sujidades. O tempo estimado para esse procedimento é de 20 minutos. Após 24 horas da aplicação, você irá retirar o filme e o hidrogel, e poderá lavar o local com água corrente e sabonete ou sabão que usa habitualmente.

---

## RISCOS

Não foram encontrados na literatura registros de efeitos adversos relacionados à aplicação dos hidrogéis de celulose bacteriana compósitos com *Aloe vera*. A amostra em teste não provocou efeitos indesejados, de qualquer natureza, em testes com animais e *in vitro* (com células).

Todos os profissionais envolvidos no estudo são treinados e capacitados para atender quaisquer problemas que possam vir a ocorrer em consequência do procedimento. Caso ocorra algum efeito indesejado relacionado aos tratamentos, como dor, edema, vermelhidão, prurido ou calor, você deverá entrar em contato com o médico participante deste estudo, o Dr. Charles Kondageski, que fará uma avaliação e prestará a assistência necessária.

---

## BENEFÍCIOS

Embora você possa não perceber benefício da aplicação dessa substância em sua pele, pois não será aplicada para fins de tratamento; todos os membros deste estudo conhecem as evidências experimentais benéficas desta nova substância relacionadas à promoção da cicatrização, quando utilizada como curativos em úlceras e queimaduras.

---

## CONTATOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Santa Catarina - em data de xxx, com registro número xxx.

Qualquer dúvida que você tenha em relação ao estudo clínico ou a este termo, ou ainda, caso queira se retirar do estudo, o contato deverá ser realizado com os pesquisadores:

Enf. Camila Quinetti Paes tel: (48) 9651-0213

Dr. Luismar Marques Porto tel: (48) 9624-2440

Dr. Carlos Rambo tel: (48) 9931-4954

Ou, ainda, com o Comitê de Ética em Pesquisas da UFSC, situado à Universidade Federal de Santa Catarina - Pró-Reitoria de Pesquisa Campus Universitário - Trindade - Florianópolis/SC, CEP 88040-900; ou pelo telefone (48) 3721-9206.

---

#### ACEITE DE PARTICIPAÇÃO

Li, compreendi e esclareci todas as informações contidas neste documento antes de assiná-lo. Confirmo, também, estar de acordo em participar voluntariamente do estudo clínico e que recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade para participar desse estudo.

Participante (ou representante legal):

---

Nome Legível (Letra de Forma)

---

Assinatura do participante

---

Assinatura do pesquisador responsável

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**Importante:** Este documento é elaborado e deverá ser assinado em duas vias: uma será entregue ao participante (sujeito da pesquisa) e a outra via ficará com o pesquisador. Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, em atendimento à CARTA CIRCULAR N° 003/2011 CONEP/CNS/MS.



## APÊNDICE C

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA CATARINA - UFSC

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO CLÍNICO DE FASE I DA AÇÃO CICATRIZANTE DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA COMPOSITAS COM ALOE VERA

**Pesquisador:** Luismar Marques Porto

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 23119813.4.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 483.389

**Data da Relatoria:** 09/12/2013

**Apresentação do Projeto:**

Estudo de Porto e colaboradores, da PG em Engenharia Química, qua avaliará produto tópico em 20 participantes normais, clínica e laboratorialmente.

**Objetivo da Pesquisa:**

Segundo os autores o Objetivo Primário é avaliar a segurança e eventuais efeitos adversos de hidrogéis de celulose bacteriana compósitos com Aloe vera aplicados em pele de pessoas rígidas. O Objetivo Secundário é avaliar a segurança da aplicação de hidrogéis de celulose bacteriana compósitos com Aloe vera aplicados em pele integra de pessoas sadias;- Avaliar a ocorrência de efeitos adversos em pele integra de pessoas hígidas, após aplicação de hidrogéis de celulose bacteriana compósitos com Aloe vera;- Avaliar a inocuidade dos hidrogéis, após aplicação contendo 20, 40 e 60% de gel total de Aloe vera, em pele integra de pessoas hígidas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Adequados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pode colaborar pelo conhecimento generalizável sobre o tema.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

Continuação do Parecer: 483.389

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pela aprovação.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

FLORIANOPOLIS, 09 de Dezembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Ylmar Correa Neto**  
**(Coordenador)**

## APÊNDICE D

### Valores de referência para os exames laboratoriais (adultos)

#### HEMOGRAMA

Hemácias	4,5 a 6,0 milhões/mm <sup>3</sup>
Hemoglobina	13 a 16 g/dL
Hematócrito	38 a 50%
VCM	80 a 100 FL
HCM	26 a 34 PG
CHCM	31 a 36 g/dl
Global de leucócitos	4000 a 11000 p/mm <sup>3</sup>
Neutrófilos segmentados	45 a 75 %
Neutrófilos bastonetes	1 a 5%
Eosinófilos	1 a 5 %
Basófilos	0 a 2 %
Linfócitos	15 a 45%
Monócitos	3 a 10%
Plaquetas	150.000 a 450.000
Glicemia jejum	70 a 110 mg/dL
Tempo de coagulação	1 a 6 min
Tempo de protrombina	11 a 14 s
Tempo de tromboplastina	25 a 35 s
Albumina sérica	3,5 a 4,8 g/dL
Proteínas totais	6 a 8,5 g/dL
TGO	até 38 U/L
TGP	até 41 U/L
Gama GT	11 a 50 U/L
Fosfatase alcalina	65 a 300 U/L
Uréia	10 a 50 mg/dL
Creatinina	0,7 a 1,5 mg/dL
Bilirrubina total	0,2 a 1,2 mg/dL
Cálcio	1,12 a 1,32 mmol/L

---

Fósforo	2,5 a 5,6 mg/dL
Cloro	96 a 106 mmol/L
Sódio	135 a 145 mmol/L
Potássio	3,5 a 5,0 mmol/L
<b>URINÁLISE</b>	
pH	4,5 a 7,8
Densidade	1.015 a 1.025
Hemácias	< ou = 10.000 células/mL
Leucócitos	< ou = 10.000 células/mL

---