



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ADAMANTINA

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

PIBIC/CNPq/UNIFAI - 2017-2018

RELATÓRIO PARCIAL
Projeto de Pesquisa - Edital 011/2017

TAIS GONCALVES QUERINO DA SILVA

**“DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS DÉRMICO-EPIDÉRMICOS POLIMÉRICOS
COM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE AGENTES BACTERICIDAS E ANESTÉSICOS”**

ADAMANTINA - SP

Fevereiro/2018

**RELATÓRIO PARCIAL DE PROJETO DE PESQUISA REALIZADO NO PROGRAMA
INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – PIBIC/CNPq DO CENTRO
UNIVERSITÁRIO DE ADAMANTINA - UNIFAI**

Título do projeto: “DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS DÉRMICO-EPIDÉRMICOS POLIMÉRICOS COM LIBERAÇÃO CONTROLADA DE AGENTES BACTERICIDAS E ANESTÉSICOS”

Bolsista: Tais Goncalves Querino da Silva

Orientadora : Dra. Márcia Zilioli Bellini

Área: Ciências Médicas

Período: 01/08/2017 a 01/01/2018

1. INTRODUÇÃO

A pele, maior órgão do corpo humano, constitui a primeira barreira de defesa do organismo, desempenhando importantes funções na homeostasia, como a regulação da temperatura corporal e a proteção contra a desidratação, além de proporcionar apoio aos vasos sanguíneos e nervos (Rodrigues *et al.*, 2008; Ratner *et al.*, 2004).

Diversos tipos de lesões podem acometer esse tecido, sendo grande parte de tais lesões reparadas espontaneamente pela proliferação das células remanescentes da derme e da epiderme. No entanto, em queimaduras graves (como as de segundo grau profundo e as de terceiro grau) e úlceras crônicas de várias etiologias, esse processo de regeneração espontânea é gravemente comprometido, havendo frequentemente a necessidade de intervenções terapêuticas (Bellini *et al.*, 2015a).

Lesões graves da pele são de difícil tratamento, requerem cuidados especiais, com longos períodos de internação, podendo ainda, levar o paciente ao óbito. Feridas profundas na pele acarretam prejuízos ao organismo como um todo, em especial aos mecanismos de defesa. A perda da integridade da pele normalmente está associada à perda de fluidos, proteínas e eletrólitos e ao aumento da susceptibilidade do indivíduo a infecções.

O rápido recobrimento da área de pele perdida ou danificada representa uma melhora do prognóstico do indivíduo sendo que uma solução corrente para esse tipo de trauma consiste em enxertos de pele humana, autólogos ou não, que hospedam o tecido conjuntivo e estimulam o desenvolvimento de vasos sanguíneos (Bellini *et al.*, 2015b, Souto *et al.*, 2006). No entanto, esta solução é limitada pela extensão da área doadora, pela condição clínica dos pacientes e pela escassez de doadores, além do que os enxertos podem ser rejeitados ou então degradados precocemente, garantindo apenas uma cobertura temporária da lesão (Souto *et al.*, 2009)

Nos últimos anos a medicina, em conjunto com engenharia de tecidos, tem apresentado grandes avanços, em especial na área da dermatologia, com o desenvolvimento de novos materiais destinados a cobertura e tratamento de lesões de pele. Diversos tipos de curativos são conhecidos, desde os tradicionais como gaze, pomadas e ataduras, até os curativos bioativos, que liberam substâncias ativas durante a cicatrização da ferida e agem diretamente nas camadas da pele, acelerando o processo de recuperação do tecido.

Curativos convencionais atuam apenas como cobertura passiva da ferida, mantendo-a protegida do ambiente. Entretanto, idealmente um curativo deve não apenas proteger a lesão, mas também promover o processo de cicatrização, proporcionando um microambiente adequado, hidratado e com isolamento térmico, removendo o excesso de exsudato e promovendo as trocas gasosas (Jayakumaret al., 2011, Wittaya-Areekul e Prahsarn, 2006). Neste contexto, propostas de terapias alternativas que busquem o restabelecimento mais rápido e efetivo da pele lesada, em especial utilizando matrizes poliméricas produzidas em laboratórios utilizando materiais com atividade biológica comprovada, são de grande relevância.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Este projeto tem com objetivo geral, contribuir para os estudos no ramo de obtenção de materiais com potencial para utilização na regeneração de lesões de pele.

2.2. Específicos

Uma vez que resultados obtidos em pesquisas anteriores apontam que membranas de quitosana complexada com xantana são bastante promissoras para a aplicação como curativos dérmicos (Bellini et al., 2015a, Bellini et al., 2015b; Bellini et al., 2012), espera-se, ao final deste projeto, o desenvolvimento de um curativo bioativo à base de quitosana, xantana com agentes bactericidas e anestésicos incorporados, contribuindo, assim, para o setor de desenvolvimento de materiais para este tipo de aplicação.

Como objetivos específicos, neste trabalho propõem-se:

- Incorporação de agente bactericida e anestésico nas membranas de quitosana-xantana;
- Determinação da eficiência de incorporação, da cinética de liberação e da eficácia dos fármacos incorporados nas membranas.
- Avaliação das características físico-químicas e biológicas das membranas produzidas;

3. METODOLOGIA

3.1. Preparo das membranas

As membranas de quitosana (Q) e xantana (X) complexadas foram preparadas com base nos procedimentos descritos por Bellini et al. (2012). Foi utilizada a razão mássica de Q:X, 1:1, com volume final de mistura de 200 mL e um grama de cada polissacarídeo.

A solução de quitosana a 1% (w/w) em ácido acético a 2% (v/v) foi adicionada através de bomba peristáltica a uma vazão de 10 ml/min à solução de xantana a 1% (w/w), sob constante agitação através de agitador mecânico de alto torque. Após a homogeneização dos polímeros, à temperatura ambiente, a suspensão obtida foi desaerada por 2 horas usando uma bomba de vácuo para a eliminação de bolhas, transferida para uma placa de petri de poliestireno (15 cm de diâmetro) e seca em estufa de circulação de ar a 37°C até a formação de uma membrana seca, por aproximadamente 24 horas.

Para a remoção do ácido acético residual, as membranas secas foram imersas em 500 mL de água destilada e deionizada por 30 minutos, repetindo-se este processo por três vezes. Em seguida, as amostras foram imersas em 200 mL de tampão Hepes a 10 mm por 30 minutos e, novamente em 500 ml de água por 30 minutos. Finalmente as membranas foram secas em estufa com circulação de ar a 37°C por 24 horas.

3.2. Caracterização das membranas Ch-Xn

Os biocurativos poliméricos foram caracterizadas quanto a morfologia, a espessura, a capacidade de absorção de água (H₂O), solução salina (SS), Fluido Corpóreo Simulado (FCS) e Meio de Cultivo Celular (MCC), quanto às propriedades mecânicas, e quanto à hemocompatibilidade (pela avaliação dos índices de hemólise e de trombogenicidade), conforme descrito a seguir.

Morfologia: A morfologia da superfície foi analisada a olho nu e registrada por meio de câmera fotográfica digital.

Espessura: A espessura das membranas foi medida através de um micrômetro (Digimess) em sete diferentes posições próximas à borda da membrana e ao centro e em ângulos de 90°. Os resultados foram expressos como médias.

Capacidade de absorção de soluções aquosas: O grau de absorção de diferentes soluções aquosas das membranas foi avaliado com base no método proposto por Rodrigues *et al.*, 2008. Amostras secas (1 cm x 6 cm) com massa conhecida (M_s) foram imersas em 7 mL de água, solução salina(SS) NaCl a 0,9% (m/v), fluido corpóreo simulado (FCS) preparado de acordo com Kokubo *et al.*, 1990 e meio de cultura RPMI (Nutricell, Brasil) suplementado com 0,3 g/L de L-glutamina, 2 g/L de D-glicose, 2 g/L de NaHCO₃, 10.000 UI/L de penicilina, 0,05 g/L de estreptomicina, 5,958 g/L de Hepes e 10% (v/v) de soro fetal bovino (Nutricell, Brazil). As massas das amostras hidratadas (M_h) em água, SS e FCS foram determinadas após 24 h, e em meio RPMI suplementado, após 144 h. O intumescimento (I) foi calculado usando a eq.(1).

$$I_{(\%)} = \frac{M_h - M_s}{M_s} \times 100 \quad (\text{Eq. 01})$$

Propriedades mecânicas: os ensaios mecânicos foram realizados em modo de tração usando um analisador de perfil de textura (TA-XT Express, Stable Micro Systems Ltd., Reino Unido) à temperatura ambiente com as amostras úmidas contendo, em média, 10 g de água por grama de membrana seca. O comprimento inicial de separação das garras de fixação das amostras foi de 15 mm, a velocidade de teste de 0.1 mm/s e a força de disparo de 0,1 g. A espessura e largura das membranas foram medidas utilizando um micrômetro digital (Mitutoya, modelo MDC-25S, Japão) e paquímetro, respectivamente. A tensão (σ) e o alongamento (E) na ruptura foram calculados através das Equações 4 e 5, respectivamente. O módulo de elasticidade (ε) foi calculado a partir do declive inicial da curva de tensão-deformação.

$$\sigma_{(MPa)} = \frac{F_m}{A_s} \quad (\text{Eq. 02})$$

$$E_{(\%)} = \frac{d_{final}}{d_{inicial}} \times 100 \quad (\text{Eq. 03})$$

onde F_m é a força máxima no rompimento em N, A_s é a área da seção transversal da amostra do filme em mm² (espessura x largura), d é a distância de separação das garras de fixação.

Hemocompatibilidade: avaliada através dos testes *in vitro* de capacidade hemolítica e trombogênica, de acordo com a International Standard Organization (ISO) 10993-4 (1999). Os testes de capacidade hemolítica foram realizados como descritos pela American Society for Testing and Materials (ASTM) F 756-00 standard (2000). Amostras de 21 cm² foram incubadas por 3 h a 37°C em 7 mL de solução sanguínea (sangue proveniente de coelho diluído em tampão fosfato salino, com concentração de 10 mg/mL de hemoglobina), centrifugadas a 2200 rpm por 20 min e a hemoglobina presente no sobrenadante quantificada através da medida da densidade ótica (DO) a 540 nm. Os controles positivos e negativos foram o sangue em água e em tampão fosfato salino, respectivamente. O índice hemolítico foi determinado através da razão entre a diferença das DOs da amostra e do controle negativo e a diferença das DOs do controle positivo e do negativo. Os materiais foram classificados, conforme a Tabela 1 como, não hemolítico, levemente hemolítico ou hemolítico, de acordo com o índice hemolítico obtido.

Tabela 1. Classificação dos materiais conforme o índice hemolítico

Índice hemolítico (%)	Classificação
0 - 2	Não hemolítico
2 - 5	Levemente hemolítico
> 5	Hemolítico

A avaliação da capacidade de formação de trombos nas superfícies das amostras foi realizada de acordo com o método descrito por Imai and Nose (1972). Sobre amostras de 3 cm x 3 cm, dispostas em placas de Petri de vidro, foram adicionados 250 µL de sangue de coelho fresco com o anticoagulante citrato ácido dextrose (Probiológica, Portugal). O processo de coagulação foi iniciado pela adição de 25 µL de 0,1M CaCl₂ sobre o sangue. As placas foram incubadas a 37 °C por 30 e 60 min. A reação foi interrompida pela adição de 5 mL de água, fixando-se os coágulos com 1 mL de formaldeído a 37 %. Os coágulos foram transferidos para papel de filtro, secos a 37°C e suas massas foram determinadas. Como controle positivo foram utilizadas as próprias placas de Petri e como controle negativo, não foi adicionado sangue na placa. Para a determinação da trombogenicidade foi utilizada a Equação 6:

$$Trombogenicidade = \left(\frac{m_{amostra} - m_{controle\ negativo}}{m_{controle\ positivo} - m_{controle\ negativo}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 04})$$

onde *m* é a massa dos coágulos da amostra, controle negativo e controle positivo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização dos biocurativos

4.1.1. Morfologia e Espessura

Os curativos de 9 cm de diâmetro apresentaram espessura média de 0,16 ± 0,02 mm na região central e 0,29 ± 0,008 mm na extremidade. A espessura de membranas destinadas ao uso como biocurativos é uma variável importante, podendo interferir na absorção e adsorção de nutrientes do meio e no transporte de gases como o O₂ e o CO₂. De acordo com Ma *et al.*, 2001, dispositivos destinados a engenharia de tecido de pele devem idealmente apresentar espessura inferior à da derme humana, que varia entre 500 e 2000µm, dependendo da idade, sexo, bem como da região do corpo.

Os biocurativos preparados foram caracterizados como translúcidos, com presença de muitas bolhas de ar na superfície. A transparência do material é uma característica relevante considerando-se a aplicação do dispositivo como curativo dérmico, uma vez que permitiria a eficaz observação do leito da ferida durante a recuperação da pele sem a sua remoção.

Na figura 01 são apresentadas imagens típicas dos biocurativos poliméricos preparados.



Figura 1. Aspecto visual dos Biocurativos Poliméricos preparados

4.1.2.Capacidade de Absorção de Soluções Aquosas

A capacidade de absorção de fluidos corpóreos é outra característica muito importante para biomateriais destinados à regeneração de pele, uma vez que a formação de exsudato em lesões cutâneas ulceradas pode ser bastante intensa. Desta forma a avaliação da capacidade de absorção de água e de diferentes soluções fisiológicas dos biocurativos preparados são de grande relevância.

Todos os biocurativos preparados apresentaram elevada capacidade de absorção de soluções aquosas, sendo $85,57 \pm 3,81$ g de H₂O/g de curativo seco, $24,55 \pm 1,68$ g de SS/g de curativo seco, $17,28 \pm 1,26$ g de FCS/g de curativo seco, $5,51 \pm 0,48$ g de MCC/g de curativo seco.

4.1.3.Propriedades Mecânicas

Além de espessura apropriada e capacidade de absorção, propriedades mecânicas como módulo de elasticidade e resistência à tração, compatíveis com as do tecido lesado, são requisitos importantes e esperados para materiais destinados à regeneração tecidual. A avaliação destas propriedades nos biocurativos preparados mostraram elevados índices de elasticidade nas amostras úmidas, com 1,46 MPa de tensão na ruptura e 20,1% de alongamento.

4.1.4.Hemocompatibilidade

Uma das exigências para um material destinado à aplicação na engenharia de tecidos é que este seja hemocompatível, ou seja, tenha uma boa afinidade com o plasma sanguíneo. A resposta inicial do sangue quando em contato com um material estranho é a adesão das plaquetas sobre as superfícies do objeto e a ativação de mecanismos de coagulação que levam a formação de trombos (Zago *et al.*, 2004). De acordo com a aplicação do biomaterial, esta característica pode ser desejável ou não. Os índices de trombogenicidade dos biocurativos foram estudados em relação ao controle positivo, o vidro, e em dois tempos de exposição ao sangue, 30 e 60 minutos. A análise da hemocompatibilidade baseia-se na quantificação da hemoglobina liberada no plasma decorrente do rompimento das hemácias do sangue. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Índices de trombogenicidade e Índice Hemolítico dos biocurativos poliméricos

Trombogenicidade (%)	
30 min	60 min
70,39 ± 18,88	95,26 ± 19,30
Índice Hemolítico	Classificação
1,39 ± 0,27	Não Hemolítico

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE AS ATIVIDADES EXPERIMENTAIS REALIZADAS

Durante o último semestre de estudos realizados junto à UNIFAI foi possível o desenvolvimento de uma pesquisa direcionada à confirmação da viabilidade do uso dos biocurativos na engenharia de tecido de pele. Para tal, estudos de caracterização físico-química, além de ensaios biológicos, foram realizados. Os resultados comprovam que curativos poliméricos de quitosana-xantana com agentes bactericidas e anestésicos podem ser uma alternativa viável para o tratamento de lesões de pele, apresentando características potencialmente importantes para a aplicação proposta como, adequada espessura e transparência, elevada absorção de fluidos corpóreos e hemocompatibilidade.

Estes resultados mostraram ser de grande relevância, pois completaram o conjunto de dados anterior e possibilitaram a apresentação de trabalhos em eventos científicos.

Por fim, menciona-se que se prevê ainda a submissão de pelo menos mais um artigo para publicação resultante da execução do projeto, considerando-se que os resultados alcançados em termos de divulgação técnica e científica como plenamente satisfatórios.

6. PRODUÇÃO CIENTÍFICA RESULTANTE DA EXECUÇÃO DO PROJETO

Trabalho apresentado em congresso internacional

Taís G. Q. Da Silva, Thalita S. L. Nakasse, Luiz Octavio A. Cianca, Yuri W. Damasceno, Márcia Z. Bellini. DESENVOLVIMENTO DE CURATIVOS POLIMÉRICOS DE QUITOSANA E XANTANA COM AGENTES BACTERICIDAS E ANESTÉSICOS. 2º Curso Integrado de Feridas Complexas. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. 16 a 17 de março de 2018

Premiação

2º Melhor Trabalho do 2º Curso Integrado de Feridas Complexas. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. 16 a 17 de março de 2018

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLINI, M.Z.; PIRES, A.L.R.; VASCONSELOS, M.O.; MORAES A.M. Comparison of the Properties of Compacted and Porous Lamellar Chitosan–Xanthan Membranes as Dressings and Scaffolds for the Treatment of Skin Lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 125, p.421-431, 2012.

- BELLINI, M. Z. ; CALIARI-OLIVEIRA, C. ; MIZUKAMI, A. ; SWIECH, K. ; COVAS, D. T. ; DONADI, E. A. ; Oliva-Neto, P. ; MORAES, A. M. Combining xanthan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 29, p. 1155-1166, 2015a.
- BELLINI, M. Z. ; BELLINI, MÁRCIA ZILIOLI ; OLIVA-NETO, PEDRO DE ; MORAES, ÂNGELA MARIA . Properties of films obtained from biopolymers of different origins for skin lesion therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology (Impresso)*, v. 58, p. 289-299, 2015b.
- Imai, Y.; Nose, Y. *Journal of Biomedical Material Research*, v. 6, p. 165–172, 1972.
- JAYAKUMAR, R; PRABAHARAN, M; SUDHEESH KUMAR, PT, NAIR, SV; TAMURA, H; Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, v.29, p.322-337, 2011.
- KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24, p. 721, 1990.
- MA, J.; WANG, H.; HE, B.; CHEN, J. - *Biomaterials*, 22, p. 331, 2001.
- RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. *Biomaterials science, an introduction to materials in medicine*. Segunda Edição. San Diego, Estados Unidos. Elsevier Academic Press, p.80-707, 2004.
- RODRIGUES, A. P.; SANCHEZ, E. M. S.; COSTA, A. C.; MORAES, A. M. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *Journal of Applied Polymer Science*, v.109, p. 2703-2710, 2008.
- SOUTO, L. R. M.; VASSALLO, J.; REHDER, J.; PINTO, G. A.; PUZZI, M. B. Immunoarchitectural characterization of a human skin model reconstructed in vitro. *Sao Paulo Medical Journal*, v.127, p.28-33, 2009.
- SOUTO, L. R. M.; REHDER, J.; VASSALO, J.; CINTRA, M. L.; KRAEMER, M. H. S.; PUZZI, M. B. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. *São Paulo Medical Journal*, v.124, p.71-76, 2006.
- WITTAYA-AREEKUL, S.; PRAHSARN, C. Development and in vitro evaluation of chitosan-polysaccharides composite wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 313, p. 123-128, 2006.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO R.P.; PASQUINI, R. *Hematologia: Fundamentos e Prática*. Editora Atheneu, São Paulo, 2004.