PAULA RODRIGUES FONTES DE SOUSA MORAES

**ESTUDO COMPARATIVO DA MEMBRANA E DO
HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA COM
COLÁGENO EM DORSO DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar

São Carlos,
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

M827e Moraes, Paula Rodrigues Fontes de Sousa
Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de
celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos /
Paula Rodrigues Fontes de Sousa Moraes; orientadora Ana
Maria Minarelli Gaspar. São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2013.

1. cicatrização. 2. biocompatibilidade. 3. celulose
bacteriana. 4. colágeno. 5. hidrogel. 6. collagenase. 7.
curativos biológicos. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

PAULA RODRIGUES FONTES DE SOUSA MORAES

Título: "Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA -
EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovada em: 28/09/2013

PROF^a. DR^a. ANA MARIA MINARELLI
GASPAR (ORIENTADORA)

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP

Resultado: APROVADA

Assinatura: [Assinatura]

PROF^a. DR^a. TICIANA SIDORENKO DE
OLIVEIRA CAPOTE

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho" - UNESP

Resultado: Aprovada

Assinatura: Ticiane Sidorenko de O. Capote

PROF. DR. JOÃO MANUEL DOMINGOS DE
ALMEIDA ROLLO

Escola de Engenharia de São Carlos - USP

Resultado: APROVADA

Assinatura: [Assinatura]

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, que sempre me mostra o melhor caminho a ser percorrido, além de me dar saúde e força para enfrentar todas as dificuldades a serem encontradas.

Dedico também a minha família, meu pai **Silvio** (*in memoriam*), minha mãe **Maria Christina** e meus irmãos **Silvio Filho** e **Henrique**, que sempre me ensinam a ser uma pessoa honesta, esforçada, além de sempre me darem muita alegria e amor.

Dedico também ao meu marido **Michael**, pela sua presença, apoio, carinho e amor dedicados desde quando nos conhecemos.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora **Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar**, que me deu a oportunidade de aprender mais para me tornar uma profissional cada vez mais completa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À colega Pós-doutoranda **Sybele Saska Specian**, pela grande ajuda na confecção das membranas de CB-COL, com a análise estatística e também pelos muitos ensinamentos.

Às empresas Fibrocel, pelas membranas de CB fornecidas.

Ao Pós-doutorando **Hernane Barud** pela recepção e grande ajuda na parte da caracterização do hidrogel de CB-COL.

Aos alunos do Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, em especial a aluna **Laís Roncalho** que me ensinou a preparar o hidrogel.

Ao **Prof. Dr. Sidney Ribeiro** pelo espaço do Laboratório de Materiais Fotônicos cedido.

Aos funcionários e colegas do programa Interunidades Bioengenharia de São Carlos pela recepção e colaboração nesse trabalho.

Ao bioterista **Nelson Ferreira da Silva Jr.** da Interunidades Bioengenharia, pela ajuda na parte experimental com os animais.

Aos alunos estagiários que mesmo com pouco tempo me ajudaram na parte experimental com os animais.

Ao **Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti** pelo apoio e cessão do seu Laboratório de Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara, para a realização da parte experimental *in vivo*.

Aos alunos do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Unesp de Araraquara, em especial a aluna **Vânia Ortega**.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara/Unesp pelo espaço concedido para a análise histológica e pelos materiais concedidos.

Aos técnicos do Departamento de Morfologia, em especial ao **Luiz Antonio Potenza** que me ajudou também na experimentação animal e no processamento de todos os cortes histológicos.

À Dra. **Virgínia da Conceição Amaro Martins** e a Profa. Dra. **Ana Maria Guzzi Plepis**, do grupo de bioquímica e biomateriais, pelo colágeno concedido.

A aluna **Denise Bonemer de Salvi** pela valiosa contribuição na análise da Difractometria de raios-X do hidrogel de CB-COL.

À mulher mais importante da minha vida, minha mãe **Maria Christina**, que é um exemplo de mulher guerreira, lutadora e vencedora, e que me ensinou a ser assim também, sempre disposta a trabalhar e aprender. Eu te amo mãe!

Aos homens mais importantes da minha vida, meus irmãos Vinho e Li, e meu marido Ti, pelo incentivo, ajuda nas correções e pela alegria que vocês me transmitem. Eu amo vocês também!

A minha amiga **Kate Andrade** pela sua presença na minha vida e pela irmã que você se tornou pra mim nos meus momentos bons e ruins.

Meus sinceros agradecimentos a todas essas e outras pessoas não citadas aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho se concretizasse.

A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original.

Albert Einstein

RESUMO

MORAES, P. R. F. S. **Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Desde o início da espécie humana, houve quem procurasse auxiliar o corpo na tentativa natural de restaurar suas partes injuriadas. Um dos grandes desafios atuais é a substituição de tecidos do organismo, inclusive em áreas de lesão cutânea. Um biomaterial pode ser utilizado para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente tecidos ou órgãos. A membrana de celulose bacteriana (CB) possui moldabilidade, boas propriedades mecânicas, permeabilidade seletiva, permitindo a passagem de vapor d'água, mas impedindo a passagem de microrganismos. O colágeno (COL) vem sendo amplamente usado como material na fabricação de biomateriais. Neste trabalho obteve-se membrana e hidrogel de CB-COL, caracterizados de diferentes maneiras. Foram realizados, estudos *in vivo*, análises macroscópica e histológica de coberturas de CB-COL, comparando com os controles (coágulo e a pomada de collagenase), após a aplicação sobre as feridas confeccionadas no dorso de ratos. Os animais foram sacrificados depois de 3, 7, 15 e 30 dias, e os dorsos processados segundo rotina histológica para coloração em HE. As caracterizações realizadas neste trabalho (microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TG), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e difratometria de raios-X (DRX)) confirmaram a incorporação do COL às matrizes de CB. A avaliação macroscópica somente demonstrou diferença estatisticamente significativa da reparação tecidual entre os tratamentos aos sete dias de pós-operatório, sendo que o hidrogel apresentou uma tendência para uma reparação mais rápida. Os resultados da avaliação histológica demonstraram diferença estatisticamente significativa para reação inflamatória tecidual entre os tratamentos em todos os períodos estudados. Na avaliação da qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas, somente o período de três dias que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Conclui-se com esses resultados que as duas coberturas são biocompatíveis.

Palavras-chave: cicatrização, biocompatibilidade, celulose bacteriana, colágeno, hidrogel, collagenase, curativos biológicos.

ABSTRACT

MORAES, P. R. F. S. **Comparative study of membrane and hydrogel bacterial cellulose with collagen on the backs of rats**. 2013. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

Since the beginning of the human race, there was those who sought to assist the body in a natural attempt to restore yours injured parts. One of the main current challenges is the replacement of body tissues, including areas of skin lesion. A biomaterial can be used to improve, enhance or replace, partially or fully tissues or organs. The membrane of bacterial cellulose (BC) has moldability, good mechanical properties, selective permeability, allowing the passage of water vapor but preventing the passage of microorganisms. The collagen (COL) has been widely used as material in the manufacture of biomaterials. In this study was obtained hydrogel and membrane BC-COL, characterized in different ways. Were realized *in vivo* studies, macroscopic and histological analyzes from dressings of BC-COL, comparing with controls (clot and collagenase ointment), after applying in wounds on the backs of rats. The animals were sacrificed after 3, 7, 15 and 30 days, and the scars were processed according to histological routine to HE staining. The characterizations performed in this study (scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), infrared spectroscopy with Fourier transform (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD)) confirmed the incorporation of the COL to matrices BC. The macroscopic evaluation only demonstrated statistically significant difference of tissue repair between treatments at seven days postoperative, and the hydrogel showed a trend for a faster repair. The results of the histological evaluation showed statistically significant difference in inflammatory tissue reaction between treatments in all periods studied. In quality evaluation, quantity and orientation of collagen fibers, only three days period didn't show statistically significant difference between treatments. We conclude from these results that the two dressings are biocompatible.

Keywords: healing, biocompatibility, bacterial cellulose, collagen, hydrogel, collagenase, biological dressings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da celulose bacteriana. Essa estrutura foi feita no software ChemSketch 11.0	33
Figura 2 - Estrutura do colágeno: Em A e B, microscopia eletrônica de transmissão de fibra de colágeno do tipo I. Em C, representação esquemática de fibra de colágeno composta pela subunidade tropocolágeno (D). Em E a formação em tripla hélice das subunidades do tropocolágeno. Na imagem F a composição pelos aminoácidos Glicina (Gly), Prolina (Pro) e Hidroxiprolina (Hypro) das subunidades de tropocolágeno (VULCANI, 2008)	39
Figura 3 - Celulose bacteriana de 5 mm de espessura padronizadas em 25 mm de diâmetro (SASKA, 2011)	47
Figura 4 - Bancada com os materiais esterilizados para o início dos procedimentos cirúrgicos	53
Figura 5 - Identificação das regiões das lesões criadas no dorso dos ratos	53
Figura 6 - Bancada com os materiais para o início da retirada das lesões cicatrizadas para a confecção das lâminas	55
Figura 7 - Paquímetro digital utilizado para medir o diâmetro das lesões	56
Figura 8 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura para colágeno (a) e (b) e para o hidrogel de CB-COL (c) e (d). As imagens (b) e (d) são os cortes transversais das amostras	61
Figura 9 - Curvas TG (----) e DTG (-----) de: (a) celulose bacteriana; (b) colágeno puro; (c) hidrogel de CB-COL. I – perda de água, II – perda por decomposição e III - deposição dos resíduos	63
Figura 10 - Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho de: (a) hidrogel de CB-COL; (b) colágeno puro; c) celulose bacteriana	64
Figura 11 - Padrões de difração de DRX do hidrogel de CB-COL (a); colágeno puro (b); CB (c) com os seus respectivos picos assinalados	65
Figura 12 - Aspecto da membrana aderida à lesão após a cirurgia	66
Figura 13 - Aspecto da membrana aderida à lesão no primeiro dia após a cirurgia	67
Figura 14 - Terceiro dia: Grupos I (membrana de CB-COL - acima) e II (controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (hidrogel de CB-COL - acima) e IV (pomada de colagenase - abaixo) à	

direita	68
Figura 15 - Sétimo dia: Grupos I (membrana de CB-COL - acima) e II (controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (hidrogel de CB-COL - acima) e IV (pomada de colagenase - abaixo) à direita	69
Figura 16 - Décimo quinto dia: Grupos I (membrana de CB-COL - acima) e II (controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (hidrogel de CB-COL - acima) e IV (pomada de colagenase - abaixo) à direita	70
Figura 17 - Trigésimo dia: Grupos I (membrana de CB-COL - acima) e II (controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (hidrogel de CB-COL - acima) e IV (pomada de colagenase - abaixo) à direita	71
Figura 18 - Reparação tecidual das lesões dos grupos I, II, III e IV em relação aos períodos experimentais de 3, 7, 15 e 30 dias. Os valores estão expressos em médias $\pm$ erro padrão	72
Figura 19 - Período de 3 dias; (a) – observa-se no grupo I, a ausência de epitélio, início de neovascularização, crosta, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (b) – observa-se no grupo II, a ausência de epitélio, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (c) – observa-se no grupo III, epitélio em processo de cicatrização, início de neovascularização, crosta e tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória média com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (d) – observa-se no grupo IV, a ausência de epitélio, crosta e tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória média com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E)	75
Figura 20 - Período de 7 dias; (a) – observa-se no grupo I, a ausência de epitélio, neovascularização, crosta e tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (b) – observa-se no grupo II, a ausência de epitélio, início da neovascularização, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (c) –	

observa-se no grupo III, epitélio em processo de cicatrização, início de neovascularização, crosta, tecido de granulação com início de organização e com reação inflamatória moderada com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (d) – observa-se no grupo IV, a ausência de epitélio, início da neovascularização, crosta e tecido de granulação com início de organização e com reação inflamatória moderada com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E) 76

Figura 21 - Período de 15 dias; (a) – observa-se no grupo I, reepitelização, neovascularização, presença de glândulas e tecido de granulação com início de organização e com reação inflamatória moderada com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares; (b) – observa-se no grupo II, reepitelização, camada de queratina, início da neovascularização, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória média com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares; (c) – observa-se no grupo III, reepitelização, neovascularização, tecido de granulação maduro e com reação inflamatória leve; (d) – observa-se no grupo IV, reepitelização completa, camada de queratina, neovascularização completa, tecido de granulação maduro e com reação inflamatória leve. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E); camada de queratina (F); presença de glândulas (G) 77

Figura 22 - Período de 30 dias; (a) – observa-se no grupo I, tecido organizado, onde se observa reepitelização, camada de queratina, neovascularização, presença de glândulas e folículo piloso; (b) – observa-se no grupo II, tecido organizado, reepitelizado, neovascularizado, camada de queratina e presença de glândulas; (c) – observa-se no grupo III, reepitelização completa, camada de queratina, neovascularização completa, folículo piloso; (d) – observa-se no grupo IV, o tecido organizado, com glândulas e folículo piloso. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E); camada de queratina (F); presença de glândulas (G); presença de folículo piloso (H) 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel (%)	49
Tabela 2 - Distribuição dos grupos em relação ao material utilizado	54
Tabela 3 - Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes	57
Tabela 4 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas presentes nos espécimes	58
Tabela 5 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à reconstituição do epitélio presentes nos espécimes	58
Tabela 6: Valores das absorvâncias associados aos números de onda 1450 e 1235 do hidrogel de CB-COL	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedade Americana para Testes e Materiais)
CB	Celulose bacteriana
CB-COL	Celulose bacteriana com colágeno
CDI	1,1'- carbonildiimidazol
CH ₂	Grupo metileno
CH ₃	Grupo metila
CO	Monóxido de carbono
COOH	Grupo carboxila
COL	Colágeno
C=O	Grupo carbonila
DMF	Dimetilformamida
DRX	Difratometria de raios-X
DTG	Termogravimetria derivada
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EGF	Fator de crescimento epidérmico
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonila
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
Gly (G)	Glicina
HE	Hematoxilina-Eosina
Hipro	Hidroxiprolina
ICDD – PDF – 2	International Centre for Diffraction Data – Power Diffraction File-2
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
KBr	Brometo de potássio

LSD	Least Significant Difference (Diferença mínima significativa)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mmii	Úlceras de membros inferiores
MMPs	Metalproteinases da matriz
NaOH	Hidróxido de sódio
NMI	N-metilimidazol
N-H	Grupo amida
OH	Hidroxila
ORC	Celulose regenerada oxidada
PDGF	Fator de crescimento das plaquetas
Pro (P)	Prolina
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
TG	Análise Termogravimetria
TGF-b	Fator de crescimento transformador básico
UV-Vis	Ultravioleta-visível
3-D	3 dimensões

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A Pele	18
1.2 Cicatrização	19
1.3 Coberturas	23
1.4 Biomateriais	30
1.5 Celulose Bacteriana (CB)	32
1.6 Colágeno	37
1.7 Pomada de Colagenase	44
2 OBJETIVOS	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 Obtenção da Membrana e do Hidrogel de Celulose Bacteriana Contendo Colágeno e da Pomada de Colagenase	47
3.1.1 Membranas de CB-COL	47
3.1.2 Hidrogel de CB-COL 8%	49
3.2 Caracterização das Micropartículas do Hidrogel de CB-COL e do Colágeno Puro	50
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	50
3.2.2 Análise Termogravimétrica (TG)	50
3.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	51
3.2.4 Difractometria de raios-X (DRX)	52
3.3 Experimentação Animal	52
3.4 Avaliação Macroscópica	55

3.5 Análise Histológica	56
4 RESULTADOS	60
4.1 Caracterização das Micropartículas do Hidrogel de CB-COL e do Colágeno Puro	60
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	60
4.1.2 Análise Termogravimetria (TG)	61
4.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	63
4.1.4 Difractometria de raios-X (DRX)	65
4.2 Avaliação Macroscópica	65
4.3 Análise Histológica	72
4.3.1 Reação Inflamatória	72
4.3.2 Reconstituição do Epitélio	73
4.3.3 Qualidade, Quantidade e Orientação das Fibras Colágenas	73
5 DISCUSSÃO	79
6 CONCLUSÃO	94
7 REFERÊNCIAS	95
8 ANEXO	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Pele

A pele apesar de ser um órgão de proteção e eliminação é também um órgão sensorial, que recebe e conduz estímulos (CHARLET, 1996). Apresenta múltiplas funções, entre as quais, protege o organismo contra a perda de água por evaporação (dessecação) e contra o atrito (STEVENS; LOWE, 2001). Atua fazendo a manutenção da temperatura corporal, pois através das suas terminações nervosas, está em comunicação constante com o ambiente por meio dos seus vasos, glândulas e tecido adiposo. Possui a capacidade de impedir invasão de microrganismos, regular a pressão sanguínea e proteger contra raios ultravioletas (SAMPAIO et al., 2001). Suas glândulas sudoríparas participam da termorregulação e da excreção de várias substâncias (IRION, 2005).

Anatomicamente, a pele humana pode ser descrita como um órgão estratificado com duas camadas principais de tecido, a epiderme e a derme e uma terceira camada variável, a subcutânea (STEVENS; LOWE, 2001).

A epiderme é a camada mais externa da pele, que abrange as células epiteliais escamosas estratificadas (STEVENS; LOWE, 2001; GENNARO, 2004), sendo elas o estrato córneo, basal, camada espinhosa e a camada granulosa (IRION, 2005). O estrato córneo, por ser o mais superficial, é o mais importante para a cosmética (GENNARO, 2004). Essa camada é a mais efetiva barreira contra infecção e contra o perigo da septicemia, a qual é ainda mais frequente causa de morte após extensas lesões do tecido cutâneo (KANGESU, 1993).

A derme apresenta função protetora e de sustentação, sendo o local onde se formam as glândulas sebáceas e os folículos pilosos. Apresenta ainda fibras colágenas, elásticas e reticulíneas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A derme tem a importante função de nutrir a epiderme, pois esta exige uma constante reposição de nutrientes necessários para manter a atividade mitótica (IRION, 2005). Descrevem-se na derme duas camadas de limites pouco distintos, que são: papilar, superficial e a reticular, mais profunda (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A hipoderme, que também é chamada de camada subcutânea de gordura, serve como amortecedor para a derme e a epiderme. Nesta camada, encontram-se fibras colágenas provenientes da derme que se cruzam entre as células gordurosas

acumuladas, fornecendo uma conexão entre as camadas superficiais da pele e da camada subcutânea (SAMPAIO et al., 2001; STEVENS; LOWE, 2001; GENNARO, 2004).

1.2 Cicatrização

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma enfermidade clínica que aciona de imediato as frentes da defesa orgânica para o reparo. O manejo tradicional de ferimentos envolve desinfecção, debridamento e provisão de um ambiente úmido que estimule o estabelecimento do melhor ambiente para que ocorra o processo natural de cura (ARNOLD Jr. et al., 1994).

As feridas podem ser classificadas quanto ao agente causador em incisa ou cortante; contusa; lacerada; perfurante; penetrante; escoriação; térmica ou queimadura; patológica; iatrogênica, amputação. Quanto à etiologia são classificadas em ferida aguda ou crônica (IRION, 2005).

Quando existem ferimentos graves e extensos, sejam eles provocados por queimaduras, abrasão da pele, avulsão de tecidos, úlcera ou perda pós-necrótica de tecidos cutâneos, há necessidade de estabelecer um tratamento adequado até que se produza a cicatrização das lesões mais superficiais e a formação de tecido de granulação das áreas mais profundas (HILÁRIO; VASQUEZ, 1988).

Mandelbaum et al. (2003) descrevem que 3% da população brasileira é portadora de algum tipo de lesão crônica. Cerca de 2,7% da população tem úlceras crônicas nos pés e pernas, porcentagem que chega a 10% nos diabéticos e que representa a segunda causa de afastamento do trabalho no Brasil. A respeito dos resultados de pesquisas isoladas e em função dos escassos registros existentes, é provável que os dados estatísticos não retratem de forma fidedigna o sério problema de saúde pública que as feridas crônicas representam (MORAIS et al., 2008).

O início da cicatrização promove a coagulação do sangue e é completado com a remodelação das camadas celulares da pele. Quando ocorre uma lesão, a integridade vascular da área lesada é interrompida levando ao extravasamento de sangue para o tecido circundante ou no plasma quando o dano é menor (THAKARE, 2011). O processo da cura é ativado quando as plaquetas entram em contato com o

colágeno exposto levando a agregação de plaquetas e a liberação de fatores de coagulação, resultando em deposição de um coágulo de fibrina no local da lesão (CLARK, 2001). Acredita-se que os fatores que influenciam o processo de cura também influenciam o aspecto final da cicatriz.

A evolução cicatricial das feridas é composta de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, e representa o esforço do corpo para restaurar a função e a estrutura natural de um tecido injuriado (SANTOS, 2000). Os fatores de ordem geral que podem afetar esta cicatrização são a idade, o estado nutricional, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, diabetes, quadros infecciosos e o uso de drogas sistêmicas. Já os fatores de ordem local que podem influenciar a cicatrização são a formação de hematomas, infecção, reação de corpo estranho, uso de drogas tópicas e ressecamento durante a cicatrização (MANDELBAUM et al., 2003). Segundo Jorge e Dantas (2005), a hipertensão arterial também interfere no processo de cicatrização da pele.

O processo de reparação tecidual compreende dois mecanismos de restauração dos tecidos: a regeneração e a cicatrização. A regeneração ocorre com a reposição tecidual “original”. O trauma inicial gera uma resposta inflamatória aguda que se manifesta através de edema e formação de exsudado seroso, rico em leucócitos, que cessa em torno de 72 horas. As células epidérmicas, das margens da ferida e das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos e glândulas (sudoríparas e sebáceas) começam a proliferar e migrar sobre o leito da ferida, ocluindo sua superfície, promovendo assim, a cicatrização (SANTOS, 2000).

Assim, segundo Maia (1987), a cicatrização é dividida em três fases fundamentais: inflamatória (três a quatro dias), proliferativa (três a quatro semanas) e maturação (a partir de então). Na fase inflamatória, ocorrem fenômenos vasculares e químicos, destacando-se o aumento da permeabilidade vascular, causada pela liberação local de histamina e serotonina, que atuam por cerca de 30 minutos sobre as vênulas. Segue-se a formação de bradicinina e prostagladina, a partir de globulinas plasmáticas, que levam à prorrogação do processo e permite a chegada de granulócitos e monócitos. Os primeiros desempenham importante papel na remoção de resíduos celulares no local da lesão. Essa fase também consiste no recrutamento de leucócitos para o local da lesão. Na ferida limpa, o pico da resposta inflamatória pode aparecer em cerca de três a quatro dias (BANKS, 1992). Os

neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a aparecer, mas na ausência de infecção e restos celulares, diminuem rapidamente em número (SWAIM et al., 1998).

Na fase proliferativa, a lesão é recoberta por tecido epitelial. É nesta fase que aparecem os fibroblastos (terceiro dia), cuja origem é discutida. Eles têm participação muito importante, pois apresentam intensa capacidade de síntese protéica e multiplicação celular, produzindo a substância fundamental (mucopolissacarídeos, glico e mucoproteínas) e o colágeno. Ocorre proliferação de capilares a partir de resíduos venulares. As células endoteliais, à medida que se multiplicam, atraem-se tendendo a formar vasos. Nessa fase há uma proliferação celular, principalmente de fibroblastos, macrófagos e de vasos sanguíneos, além da proliferação e migração de queratinócitos, células endoteliais e reepitelização, formando tecido de granulação com uma grande quantidade de colágeno do tipo III (THAKARE, 2011).

Na última fase, a maturação, a maioria das fibras de colágeno tipo III é substituída por fibras tipo I, e o excesso de colágeno é degradado por enzimas proteolíticas que promovem a remodelação do tecido (MESTER et al., 1985; MAGALHÃES et al., 2008). Nessa mesma fase, na medida em que o colágeno vai sendo produzido, ocorre a oclusão da ferida, os capilares se organizam, os fibroblastos diminuem em número e observa-se a queda da produção de substância fundamental. Cumpre, entanto, salientar que tais fases da cicatrização não constituem processos isolados, mas apresentam dinamismo visível, que, com frequência, sobrepõe-se uns aos outros. Numa mesma fase, podem-se encontrar os elementos que compõem as fases subsequentes (ROBBINS, 2000).

O processo de cura de feridas pode ser classificado em três tipos: cura por primeira intenção, cura por segunda intenção e cura por terceira intenção, dependendo da natureza das margens das feridas curadas. Em feridas cicatrizadas por primeira intenção, as margens são bem fechadas e não fica nenhuma cicatriz. Por outro lado, a cicatrização de feridas por segunda intenção envolve a formação de tecido de granulação, que preenche os espaços entre as margens da ferida e está associada a uma perda significativa de tecido, deixando pequenas cicatrizes. Feridas curadas por terceira intenção são geralmente as que estão abertas durante três a cinco dias, geralmente resultando na formação de uma cicatriz extensa (THAKARE, 2011). Na cicatrização por segunda intenção, o tecido de granulação, formado pela proliferação de fibroblastos e capilares, constitui uma barreira contra

infecção, superfície para a migração do epitélio e tem papel na contração da ferida (SWAIM et al., 1998).

Uma das principais funções dos fibroblastos é a síntese de colágeno (TIAGO, 1995), sendo que a resistência da cicatriz é determinada pela velocidade, quantidade e qualidade da deposição do mesmo (WITTE; BARBUL, 1997). A atividade metabólica dos fibroblastos, que invadem a região sob reação inflamatória, irá contribuir para a formação do chamado tecido de granulação, importante para o processo de epitelização final, tal como são os monócitos e neutrófilos (BRITO FILHO et al., 2006).

O tecido de granulação ao se contrair, retrai as margens da ferida da pele para o centro da ferida permitindo que a área a ser reepitelizada se torne menor. Quando a granulação é excessiva, ocorre um retardamento da cicatrização. A prevenção pode ser obtida pelo favorecimento de uma cicatrização subcrosta, sendo que a formação da crosta em feridas não exsudativas favorece o processo de cicatrização. O seu aparecimento pode ocorrer pelo uso de várias substâncias, como o tanino. Quando numa ferida persiste o exsudato, ocorre desagregação da crosta e favorece o desenvolvimento de germes entre ela e o tecido de granulação (OLIVEIRA, 1992). Moseley et al. (2003) apontam ser fundamental a habilidade das coberturas em conter o exsudato em seu interior, tal que na remoção da superfície da ferida, a dispersão bacteriana é minimizada.

Cullen et al. (2002) assinalam que a cicatrização da ferida normal é um processo cuidadosamente equilibrado entre os fatores destrutivos necessários para remover o tecido necrosado e a atividade que conduz à formação de tecido novo. As proteases e o fator de crescimento possuem um papel regulador essencial nesse equilíbrio que, se rompido, pode favorecer a degradação tecidual e retardar a cicatrização, uma característica das feridas crônicas.

Na fase final da cicatrização, as feridas podem apresentar collagenases que atuam na posterior absorção de parte do colágeno. A collagenase age especificamente quando ainda há inflamação aguda, realizando a degradação do colágeno instável com maior eficácia, contribuindo para a transformação do tecido inflamatório em tecido conjuntivo jovem (LAZARUS et al., 1968).

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na cicatrização de feridas é muito importante para a compreensão dos possíveis efeitos de métodos terapêuticos que podem auxiliar o processo de cura. A cura de feridas da pele requer a

participação de várias linhagens celulares, e cada uma dessas células pode se comportar de forma diferente com base na terapia utilizada (PINHEIRO et al., 2006).

A melhor conduta para favorecer a cicatrização de uma ferida, segundo Johnston (1990), é a remoção de fatores inibitórios, bem como a correção de deficiências nutricionais. No entanto, é importante lembrar que uma série de agentes tópicos, tais como antissépticos, antibióticos e coberturas exercem algum efeito no local da ferida, sendo em alguns casos tão adversos que prejudicam a cicatrização. Antissépticos e determinadas substâncias químicas destroem bactérias, mas também lesam as células corporais. Os principais fatores que podem favorecer a cicatrização são: programas de controle de infecções; combate ao estresse, devido a sua má interferência no equilíbrio hormonal orgânico; uso de substâncias farmacológicas que comprovadamente apresentem favorecimento do processo cicatricial (MARTINS et al., 2006).

Estudos recentes asseguram que o avanço no campo da cicatrização reside no equilíbrio entre a síntese e o fracionamento do colágeno. Uma cicatrização mais efetiva pode ser conseguida com a introdução de aceleradores da cicatrização das feridas no local da sutura (THORNTON; BARBUL, 1997). A cicatrização representa uma série de eventos celulares, bioquímicos e fisiológicos altamente dinâmicos e integrados. Embora os componentes individuais da reação de cicatrização como a multiplicação e migração celular, síntese e combinação do colágeno ocorram em culturas de tecidos ou em sistemas acelulares, as feridas não cicatrizam *in vitro* (SANTOS, 2000).

1.3 Coberturas

Borges (2012) explica que o termo curativo é o ato de limpar, desbridar e cobrir lesões. Os materiais desenvolvidos para o curativo das feridas são denominados coberturas, que foi um dos objetivos desse estudo, obter coberturas à base de CB-COL.

A existência de uma variedade de tipos de feridas, com suas fases e modos variados de cicatrização, levou à evolução de diferentes tipos de coberturas. Estas, antes de 1960, eram consideradas apenas como produtos passivos que tinham um mínimo papel no processo de cura das lesões, porém, a pesquisa pioneira de Winter (1962), iniciou o conceito da importância de um ambiente ideal para a cicatrização

das feridas e do ativo envolvimento das coberturas para estabilizar e manter tal ambiente. Esta consciência resultou, partindo dos materiais passivos tradicionalmente conhecidos, no desenvolvimento de coberturas funcionalmente ativas, que através da interação com as feridas que recobrem, criam e mantêm a umidade no campo de cicatrização.

Exemplos de tentativas de cicatrização foram relatados na Índia, China e nos países árabes, onde as coberturas eram cuidadosamente prescritas como o transplante de partes do corpo como a pele. Na literatura está descrito que, na pré-história, vários agentes como extratos de plantas, água, neve, gelo, frutas e lama eram aplicados sobre as feridas. Na Mesopotâmia, as feridas eram lavadas com água ou leite, e a cobertura era realizada com mel ou resina, sendo que a lã de carneiro, as folhas e cascas de árvores eram utilizadas para a cobertura das lesões (WIEMAN, 1998).

Apesar da transferência de conhecimento de uma geração para a outra, a maior parte dele é fundamentado no empirismo. É importante enfatizar que algumas plantas utilizadas pela população, de fato, apresentam propriedades terapêuticas, mas outras também causam grande toxicidade. Este fato torna o uso indiscriminado de fitoterápicos um risco (OLIVEIRA et al., 2001).

Métodos alternativos para o fechamento da ferida foram desenvolvidos e aperfeiçoados nas últimas décadas (LAUTO et al., 2010). Os métodos atuais utilizados no tratamento de feridas de difícil cura incluem desbridamento, irrigação, antibióticos, enxertos de tecidos e enzimas proteolíticas (NAYAK, 2006). Ao longo dos séculos, procurou-se verificar a ação de substâncias químicas e/ou de procedimentos que pudessem agilizar o processo, quer na ferida limpa, quer na contaminada ou infectada (ARAÚJO et al., 1987).

Existe atualmente, mais de 2.000 tipos de coberturas disponíveis no mercado internacional destinadas às feridas e queimaduras, o que provoca inúmeras dúvidas a respeito da melhor indicação terapêutica (YAGUISHITA, 2007). O reconhecimento do papel da nutrição e de processos de doenças associadas permitiu aos médicos e cirurgiões melhorarem o prognóstico destes ferimentos, tanto dos cirúrgicos quanto dos traumáticos. Estes são mais eficientemente curados quanto maior atenção é dada ao bom condicionamento geral do corpo, isto é, onde um ambiente fisiológico adequado ao processo de cura estiver disponível (WIEMAN, 1998). Uma cobertura ideal seria aquela que prevenisse a cicatrização exagerada, não promovesse reação

de corpo estranho, não tivesse a necessidade de realizar sua obtenção em outro sítio corpóreo nem efetuar a sua retirada posterior do local onde foi implantada (PANERARI et al., 2008).

Uma cobertura ideal segundo TURNER (1984) e GIRARDI (2005) segue os critérios, que incluem:

- Provisão e manutenção de um ambiente úmido;
- Proteção da ferida contra infecções secundárias, agindo como uma barreira antibacteriana;
- Permissão de que possam ocorrer trocas gasosas adequadamente;
- Provisão de isolamento térmico, livre de partículas ou contaminantes tóxicos;
- Manejamento do excesso de exsudato, permitindo uma remoção não traumática;
- Elasticidade e não antigenicidade;
- Ter um baixo custo;
- Tem que ser durável;
- Ser ajustável a feridas com superfícies irregulares.

Segundo a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986, o termo bioinerte (material que não sofre e nem causa reação quando entra em contato com o organismo) não é adequado, já que todo material induz a algum tipo de resposta ao tecido hospedeiro, mesmo que mínima, por este motivo deve ser evitado. No entanto, o termo ainda é comumente utilizado, como sendo um material que apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro (KAWACHI et al., 2000).

Pelo fato de coberturas convencionais apresentarem limitações na aplicação em ferimentos com grande perda de tecido, as pesquisas para a invenção de coberturas mais avançadas resultam no desenvolvimento de coberturas sintéticas e biológicas (PURNA, 2000).

A classificação mais usada para as coberturas é a que se baseia na composição do material e podem ser classificadas como sintéticas (derivadas de produtos manufaturados ou desenvolvidos em laboratório) e biológicas (derivadas de tecidos naturais) (PURNA; BABU, 2000). As coberturas biológicas podem ser derivadas de várias formulações e combinações com colágeno, elastina e lipídeos (BARTLETT, 1981), restauram a barreira de gases e previnem a desidratação da

ferida; diminuem a evaporação por perda de calor; diminuem a perda de proteína e eletrólitos pelo exsudado do ferimento; previnem a contaminação bacteriana protegendo a ferida e o paciente da sepse; permitem trocas menos dolorosas das coberturas; permitem um deslizamento indolor sobre as articulações; facilitam o desbridamento da ferida; promovem boa granulação no tecido que dará base para o auto enxerto em feridas profundas; podem ser usadas para testar o subsequente auto enxerto; diminuem o tempo de cicatrização em regiões doadoras de pele para enxertos e em áreas que sofreram queimaduras com perda parcial de tecido; melhoram a qualidade da cicatrização, inibem a presença excessiva de fibroblastos e diminuem a contração (WINTER, 1962).

As coberturas sintéticas são as produzidas com tecido, como gaze. Elas proporcionam uma pequena ou nenhuma oclusão e permitem a evaporação da umidade, resultando numa ferida excessivamente ressecada. Foi observado que, mesmo 64 camadas de gaze não conseguem evitar a contaminação da ferida por bactérias exógenas (OWENS, 1943). Isto levou à origem das coberturas compostas que é uma mistura de gaze de malhas largas impregnadas com parafina de grau médico, que resulta numa cobertura relativamente não aderente. Nos anos 80, começou a ser testada a incorporação de agentes antibacterianos, como ácido carbólico e cloridrato de mercúrio, cremes com penicilina e polimicina em combinação com coberturas absorventes. Mais tarde foi iniciado o uso de polímeros de silicone em lugar da parafina, por serem menos aderentes ao ferimento, tornando suas trocas menos traumáticas (PURNA, 2000).

Os filmes são coberturas homogêneas compostas por uma lâmina de polímero com adesivo em um dos lados. Eles são extremamente elásticos e transparentes. Os polímeros mais comumente usados incluem poliuretano, polietileno, policaprolactona, politetrafluoroetileno e dimetil aminoetil metacrilato. Coberturas de filmes são bastante apropriadas para feridas superficiais, mas devida sua falta de capacidade de absorção e por serem impermeáveis a vapores e gases, causam acúmulo de fluídos por baixo da cobertura, permitindo vazamento de exsudato e entrada de bactérias exógenas na superfície da ferida. Além do mais, não são convenientes para ferimentos grandes. Esses tipos de coberturas são encontrados no mercado como: Tegaderm®, Dermafilm®, Opsite®, Opraflax® (STEPHEN, 1990). Existe também o CollatampFacie®, membrana de colágeno tipo I, derivada de tendão de Aquiles de bovinos, associada a um equivalente epidérmico

temporário (ROBSON et al., 1992, RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000). Há também o Dermagraft[®], uma tela dérmica, metabolicamente ativa, que contém proteínas da matriz (colágenos tipo I, III, V e VII, elastina, fibronectina e tenascina), fatores de crescimento presentes na derme humana e glicosaminoglicanos (RUSZCZAK; SCHWARTZ, 2000). O Biobrane[®], membrana de silicone com nylon ligado a peptídeos do colágeno dérmico, que é um substituto temporário de curto prazo, semipermeável, com boa aderência e flexibilidade (ROBSON et al., 1992). O Duoderm[®] é uma membrana impermeável com camada profunda de partículas hidroativas agregadas em polímero inerte, funcionando como uma cobertura hidroativa (HERMANS; HERMANS, 1986). A pele artificial IntegraTM é um material artificial composto por duas camadas. A primeira, externa, é composta por uma membrana de silicone. A camada interna é altamente porosa e composta por colágeno de origem bovina e glicosaminoglicano (condroitina-6-sulfato) (KING et al., 1997; KREMER et al., 2000; MOIEMEN et al., 2001).

A regeneração tecidual *in vivo* utiliza o processo de cicatrização natural do organismo, proporcionando um resultado mais próximo ao real e clinicamente mais aceitável que o estudo *in vitro* (TABATA, 2000). Porém, para esse tipo de regeneração, uma barreira física é essencial, afinal, quando ocorre lesão tecidual, a área ao redor é gradualmente preenchida por tecido fibroso, impossibilitando o reparo por tecido original. Dessa forma, ao se inserir uma membrana junto à lesão, previne-se o crescimento de tecidos indesejáveis (TABATA, 2001).

As coberturas espumosas são lâminas de soluções espumosas de polímeros como polivinilálcool e poliuretano que são superiores às coberturas de filmes por proporcionarem isolamento térmico e auxiliarem na manutenção de um ambiente úmido na superfície da ferida. Além do mais, elas são permeáveis aos gases, não aderentes, leves e confortáveis. Têm a vantagem de se moldarem à superfície, facilitando o tratamento de feridas com cavidades irregulares. Coberturas em “spray” são mais confortáveis para a superfície da lesão e são totalmente portáteis. A maioria deles são copolímeros, por exemplo, Aeroplast[®]. Outros estudos resultaram no desenvolvimento de coberturas compostas da combinação de “spray” e espumas, por exemplo, uma espuma à base de gelatina usada sob a forma de “spray” (PURNA, 2000). Filmes em spray já existem desde 1950, mas foram relatados que produzem problemas de propagação de bactérias quando usado em feridas abertas de terceiro grau (KANE et al., 1996). “Hydron” é uma cobertura à base de poli (2-

hidroxietil metacrilato) e polietileno glicol, que é formado *in situ* sobre a ferida, por pulverização, mas o seu alto custo limita o seu uso sobre coberturas simples (NATHAN et al., 1975; HUSAIN, 1983).

As coberturas compostas são laminados compostos de duas ou mais camadas. A mais externa é designada à durabilidade e elasticidade, e pode servir como controladora da taxa de evaporação de água, enquanto a mais interna é designada para máxima aderência e elasticidade. Essas coberturas podem ser classificadas em: Hidrocolóides – são formulações contendo um coquetel de adesivo elástico e de agentes colóides (Granuflex[®], Epigard[®], Biobrane[®], etc); Lâminas de hidrogel – são lâminas reticuladas em 3-D de polímeros hidrofílicos com ligações cruzadas, que interagem com soluções aquosas. Devido a uma habilidade refrescante única, eles podem ser de grande benefício para o uso nos primeiros socorros em queimaduras; Hidrogel amorfo – estes são semelhantes ao anterior, mas não são ligados transversalmente para formar uma lâmina tridimensional. Contém pequenas quantidades de colágeno, alginato ou complexo de carboidratos, e são únicos na habilidade de doar umidade para escaras ressecadas e facilitar o debridamento autolítico. Essas coberturas exibem taxas de fechamento e reepitelização mais rápidas quando comparadas com as coberturas hidrocolóides (GOKOO; BURHOP, 1993). Hidrogéis, devido ao seu teor de água significativo, possuem um grau de flexibilidade semelhante ao tecido natural (GULREZ et al., 2011); Géis – HEMA[®] é um hidrogel biocompatível e atóxico baseado em hidroxietil metacrilato; o PHEMA PEG[®] (Hydran) é um hidrogel que se forma diretamente sobre a superfície lesada; o Geliperm[®] que é formado pela polimerização da agarose e da acrilamida. As coberturas super absorventes têm uma configuração em ilha consistindo de uma porção adesiva extrafina de hidrocolóide tendo na área central uma trama não absorvível cobrindo as partículas superabsorventes aderidas internamente (Combiderm[®]). Todas estas coberturas citadas anteriormente têm ação temporária e não auxiliam nas injúrias causadas por queimaduras extensas. Entretanto, problemas crônicos de perda de pele devem ser resolvidos pelo uso de materiais alternativos que promovam o fechamento da lesão. Este problema deu ensejo ao interesse em se desenvolver coberturas biológicas (PURNA, 2000).

Os termos géis e hidrogéis são usados diferentemente por alimentos e biomateriais para descrever estruturas de rede de ligação cruzada poliméricas. Os géis são definidos como um sistema de *cross-linked* consideravelmente diluído, e

são classificados principalmente como forte ou fraco, dependendo do seu comportamento de fluxo em estado estacionário (FERRY, 1980). O gel forte tem fortes ligações físicas entre as cadeias de polímero e é efetivamente permanente a um dado conjunto de condições experimentais. Assim, os géis fortes são análogos aos géis químicos. Exemplos de ligações físicas fortes são hélices duplas e triplas. Géis físicos fracos têm ligações reversíveis formadas a partir de associações temporárias entre as cadeias (GULREZ et al., 2011). Estas associações têm vida útil finita, rompendo e reformando continuamente géis comestíveis que são amplamente utilizados na indústria e, principalmente, referem-se a polissacarídeos gelificantes (ou seja, hidrocolóides) (MURPHY, 2000). O termo hidrogel descreve estruturas de rede tridimensionais obtidas a partir de uma classe de polímeros sintéticos e/ou naturais que possam absorver e reter quantidade significativa de água (ROSIAK; YOSHII, 1999). A estrutura do hidrogel é criada pelos grupos hidrofílicos ou domínios presentes numa rede polimérica após a hidratação num ambiente aquoso.

Em 1960, Wichterle e Lim desenvolveram o primeiro hidrogel polímero sintético baseado em metacrilato de 2-hidroxietilo (2-HEMA). Seu uso como biomaterial no plasma sanguíneo artificial foi predominante na II Guerra Mundial (RAO et al., 1985; BRANT, 2008). Feridas de diferentes formas e tamanhos podem ser preenchidas quando são utilizadas coberturas no estado líquido e gel (GOERTZ et al., 2010).

As coberturas biológicas são derivadas de várias formulações e combinações de colágeno, elastina e lipídeos (BARTLETT, 1981). Eles variam de aloenxerto (doadores da mesma espécie, como parentes, cadáveres), hetero-enxertos de porcos, cães e outras espécies, membranas embrionárias, peles de embriões e recém-nascidos, filmes de colágeno reconstituído de bovinos e outras fontes, fibrina, enxerto de epiderme cultivada, enxerto de matriz dérmica e enxertos de matriz dérmica composta cultivada (PURNA, 2000).

A engenharia de tecidos é um campo emergente e multidisciplinar que envolve biologia, medicina, engenharia, e que é suscetível a revolução das formas que podem melhorar a saúde e a qualidade de vida de milhões de pessoas no mundo por restaurar, manter ou reforçar o tecido e as funções dos órgãos (TSUBOI; RIFKIND, 1990). O requisito básico para um material ser utilizado para fins de engenharia de tecidos é a biocompatibilidade, embora durante as duas últimas décadas avanços significativos têm sido feitos no desenvolvimento de polímero

biodegradável, que degrada com o tempo e é substituído com os tecidos recém-regenerados (KANANI et al., 2010).

Os estudos de biocompatibilidade de enxertos de Bonzon et al. (1995), mostram que nos primeiros oito dias, aparecem edema ao redor do tecido e reação inflamatória ao lado do implante. Há uma concentração maior de células inflamatórias, na sua maioria de linfócitos e de células polimorfonucleares, na interface entre o implante e o tecido conjuntivo. Após 15 dias, pode ser observada proliferação de alguns capilares no tecido conjuntivo e no local de implantação. No 21º dia, foi constatada a diminuição da resposta inflamatória e o início da resposta fibroblástica. Com 30 dias, não se notou resposta inflamatória e o tecido conjuntivo estava quase normal, parcialmente organizado e orientado. Com 60 dias, há síntese do colágeno, resposta fibroblástica e após 90 dias observa-se tecido conjuntivo normal, novo e organizado.

Como a engenharia de tecidos é uma área relativamente nova, pesquisadores vêm buscando a padronização da terminologia e da metodologia de pesquisa e aplicação dos produtos preparados. A regulamentação vem sendo feita por normas da American Society for Testing and Materials – ASTM (F2312-03, F2027-00e1 e F2150-02e1) e por órgãos governamentais de países da Europa, Canadá, Japão e outros (LLOYD-EVANS et al., 2004), de forma a assegurar a seus usuários a confiabilidade do produto.

1.4 Biomateriais

Um dos grandes desafios atuais da cirurgia moderna tem sido a substituição de tecidos do organismo, inclusive em áreas de lesão cutânea, isso por meio do uso de implantes ou de inclusões de materiais sintéticos, de produtos artificiais ou de biomateriais (FREDEL; BARRA, 2004).

Um biomaterial é definido como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, de natureza sintética ou natural, que pode ser utilizada por um período de tempo, para melhorar, aumentar ou substituir parcial ou inteiramente tecidos ou órgãos. São exemplos, materiais que substituem ou induzem o crescimento de tecido ósseo, cartilagens, ligamentos, peles e reparação de tecido, como a polpa dentária (FRANKE, 2003). Park (1984) define o biomaterial como substâncias sistêmicas, farmacologicamente inertes, idealizadas para implante ou

incorporação por um sistema vivo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não, servir como veículo, matriz suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido. A ciência dos biomateriais envolve a medicina, as ciências naturais e a engenharia, delimitando duas grandes áreas: *biotecnologia* (aplicação da biologia moderna, particularmente a manipulação genética de microrganismos à medicina, química, além de outras aplicações); *bioengenharia* (compreende a interação entre as ciências naturais e engenharia, direcionada para a medicina).

Segundo a sua natureza química, um biomaterial pode ser classificado em duas grandes categorias: os naturais, que incluem o colágeno, a fibroína da seda, a queratina, a elastina, polissacarídeos e tecidos como o pericárdio bovino, serosas (bovina e porcina) e os sintéticos, que incluem as cerâmicas, os polímeros sintéticos, metais e ligas metálicas, e os materiais compósitos (PARK, 1984).

Polímeros naturais, como colágeno, proteoglicanos, glicosamionoglicanos e elastina além de biocompatível, participam no controle da estrutura do tecido e na regulação do fenótipo celular. Assim, o colágeno, principal composto orgânico do tecido ósseo, vem sendo amplamente usado como material na fabricação de biomateriais (KIM; MOONEY, 1998).

Do ponto de vista geral, um biomaterial deve apresentar as seguintes características: ser biocompatível, isto é, não induzir as respostas teciduais ou imunológicas adversas; não ser tóxico ou carcinogênico; ser quimicamente projetado para suas funções de uso; possuir estabilidade mecânica adequada ao seu uso; peso e densidade adequados; ter custo relativamente baixo; ser reproduzível e de fácil fabricação; e estimular reações biológicas favoráveis em relação a sua função de uso. Entre estas características, a biocompatibilidade é ponto de destaque, pois é a primeira qualidade importante do ponto de vista biológico de um biomaterial. A biofuncionalidade é observada quando a biocompatibilidade é adequada. Quando um material estranho ao hospedeiro entra em contato com o tecido ou com os fluídos biológicos, respostas de proteção são desencadeadas e se manifestam em primeira instância como processos inflamatórios ou imunológicos visando à eliminação do corpo estranho (PARK, 1984).

Entre os biomateriais que estão no mercado, existem alguns produtos empregados na sua fabricação, pelo processo de engenharia tecidual de alta tecnologia (ORGILL; SKRABUT, 1982; ORGILL et al., 1996; MUHART et al., 1999;

MOIEMEN et al., 2001). Dentre estes, encontra-se o GraftsKin[®], tecido equivalente à pele, bilaminado, produzido a partir da pele do prepúcio de recém-nascidos de humanos e de uma matriz de colágeno bovino tipo I, purificada e condensada, associada à suspensão de fibroblastos dérmicos (MUHART et al., 1999).

Pesquisas que avaliam a aplicação de novos biomateriais e produtos médico-hospitalares (diferentes tipos de colchões que diminuem a pressão e estimulam a circulação; os aliviadores de pressão para áreas de risco como calcâneos; e coxins para auxílio no reposicionamento do corpo) de natureza diversa, mostram-se relevantes para o tratamento de feridas. Buscam-se meios para acelerar o processo de cicatrização, minimizando o desconforto do paciente, facilitando a prestação dos cuidados de enfermagem e da equipe multiprofissional, e diminuindo o tempo de internação, além dos custos hospitalares (OLIVEIRA et al., 2010).

1.5 Celulose Bacteriana (CB)

A maioria das celuloses é produzida por plantas vasculares. Além delas, a síntese de celulose também ocorre na maioria dos grupos de algas, em várias espécies de bactérias e no reino animal (SAXENA; BROWN, 2005). A celulose bacteriana, diferentemente da celulose das plantas, não contém lignina e hemicelulose (SANCHAVANAKIT et al., 2006). É um material altamente hidrofílico e tem a possibilidade de ser moldado em estruturas tridimensionais durante a síntese (HELENIUS et al., 2006). Em 1984, o microbiologista Luís Fernando Xavier Farah conseguiu através da fermentação de bactérias do gênero *Acetobacter* produzir a celulose bacteriana. Ela é extremamente hidrofílica e possui cristalinidade superior à da celulose vegetal (BARUD et al., 2007), sendo que suas fibras de celulose são nanométricas (“nanocelulose”), organizadas em um arranjo estrutural tridimensional, com excelente resistência mecânica à tração. Essa rede de fios nanométricos lhe confere enorme área superficial, surpreendente capacidade de absorção e retenção de água, boa elasticidade, além de ser facilmente moldável (JONAS; FARAH, 1998; MACEDO, 2008).

A celulose é composta de uma cadeia linear de polímeros de β -1,4-glicose (moléculas de alto peso molecular) (Figura 1). As cadeias de glicose na celulose tipo I estão dispostas paralelamente e alocadas ao lado de microfibrilas com 3 mm de espessura. A síntese dessas microfibrilas ocorre através de um processo

extracelular envolvendo uma adição sequencial de resíduos de glicose. As microfibrilas se alongam a partir de complexos de síntese terminais que se movem na superfície plana da membrana plasmática (BENZIMAN et al., 1980).

Figura 1 - Estrutura química da celulose bacteriana (KLEMM et al., 2001).

A *Acetobacter* sp. é uma bactéria gram negativa, pertencente à família Pseudomonodaceae, definida como bactéria acética por ter a habilidade de converter etanol em ácido acético na presença de ar. A celulose bacteriana é um polissacarídeo excretado extracelularmente por diversas bactérias, entre elas a bactéria *Gluconacetobacter xilinuns*, anteriormente conhecida como *Acetobacter xylinum*, em longas nanofibras não agregadas (BROWN et al., 1976). Esta bactéria constrói uma película de celulose bacteriana, entre o meio de cultura e a superfície gasosa, que tem em um lado uma superfície densa e uma camada gelatinosa do lado oposto, que está em contato com o líquido (BACKDAHL et al., 2006). Mateos (2004) pontua que essa bactéria sintetiza grandes quantidades de celulose pura em 48 a 72 horas, enquanto que as acetobactérias encontradas comumente em frutas em decomposição levam entre 10 a 20 dias para produzir aproximadamente uma tonelada de celulose.

Essa estrutura nanofibrilar pode vir a ser uma matriz viável para auxiliar a cura de lesões dérmicas (CZAJA et al., 2007) e vem sendo desenvolvida e utilizada em diversas aplicações médicas, como: substitutos temporários de pele no tratamento de lesões, queimaduras, úlceras, enxertos, como cobertura de ferimentos e auxiliar em abrasões dérmicas (SANCHAVANAKIT et al., 2006). Um substituto dérmico ideal, por exemplo, deve ser capaz de funcionar como um guia para as células na reparação de áreas teciduais e como um *scaffold* para fibroblastos para sintetizar componentes de matriz extracelular (CROCE et al., 2004). Os estudos de

Helenius et al. (2006), contribuem com um maior conhecimento sobre a celulose bacteriana *in vivo* e sua interação com células.

A degradabilidade da celulose bacteriana não está completamente esclarecida nem *in vitro*, nem *in vivo* (BACKDAHL et al., 2006), mas a degradação da celulose em tecidos animais e humanos é considerada limitada, em virtude da ausência de hidrolases que atacam a ligação β (1,4) da cadeia de celulose. As pontes de hidrogênio dos grupos hidroxila, que mantêm as cadeias da celulose juntas, fazem com que a celulose bacteriana tenha um alto grau de cristalinidade, baixa solubilidade e degradação pobre *in vivo* (HELENIUS et al., 2006).

O sucesso de um suporte a ser utilizado em engenharia de tecidos depende, em parte, da adesão e crescimento das células de interesse na sua superfície. A superfície química do material pode definir a resposta celular ao material e, desta forma, afetar a adesão, proliferação, migração e função das células (DEE et al., 1998). A interação das células com as superfícies dos materiais é de extrema importância na efetividade de implantes médicos (CRAIGHEAD et al., 2001), podendo definir o seu grau de rejeição. O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e um melhor entendimento dos processos a nível celular durante a adesão podem colaborar para o desenvolvimento de novos biomateriais e para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (KUMARI et al., 2002). Segundo Svensson et al. (2005), a celulose bacteriana tem potencial para ser utilizada como substrato na engenharia de tecidos, devido às suas propriedades que incluem alta capacidade de retenção de água (hidrofilicidade), alta cristalinidade, uma rede de nanofibras, e alta resistência à tensão.

Comparado com outros polímeros biodegradáveis como colágeno, a quitosana e a gelatina, a celulose bacteriana apresenta propriedades mecânicas superiores. Devido à sua moldabilidade, a celulose bacteriana também está sendo usada para tecidos artificiais cardiovasculares e cirurgia de nervos. Essa película, após o processamento e fluidos, é dotada de permeabilidade seletiva, permitindo a passagem de trocas gasosas e de fluidos, mas impedindo a passagem de microrganismos (WAN et al., 2007). As características físicas e de biocompatibilidade da celulose bacteriana (Bionext[®]), assim como a possível facilidade de colocação e a provável dispensa de procedimento para sua remoção posterior, podem ser vantajosos nos casos em que evidenciamos uma cicatrização exagerada (PANERARI et al., 2008).

A celulose bacteriana tem sido utilizada com sucesso como cobertura em úlceras crônicas, queimaduras, dermabrasões e áreas doadoras de pele. Também foi utilizada como substituta de meninge e como material de revestimento de stents intravasculares para evitar estenose circunferencial em artérias de largo calibre (COSTA; SOUZA, 2005; CZAJA et al., 2006).

Em outro estudo experimental com cães, Mello et al. (1998) observaram que a celulose implantada em lesão no córtex cerebral apresentou aos 7 e 30 dias de acompanhamento pequena quantidade de células gigantes. A partir daí, houve progressiva regressão da reação histoplasmocitária e, aos 90 dias, a celulose estava circundada por reação inflamatória leve.

Para a regeneração, uma barreira física é essencial, afinal, quando ocorre lesão tecidual, a área ao redor é gradualmente preenchida por tecido fibroso, impossibilitando o reparo por tecido original. Dessa forma, ao se inserir uma membrana junto à lesão, previne-se o crescimento de tecidos indesejáveis (TABATA, 2001). Oréfice et al. (2006) e Filadelpho (2009) observaram que as membranas de celulose implantadas no dorso de ratos apresentaram células inflamatórias como leucócitos e macrófagos, bem como o aumento do número de fibroblastos presentes nas áreas operadas.

Iamaguti (2007) sugere que a membrana de celulose pode acelerar o processo de reparação na cartilagem articular e direcionar e organizar a resposta cicatricial.

A membrana de celulose vem sendo testada nas mais variadas áreas desde a utilização como pele artificial até em indústrias para confecção de coletes a prova de projéteis de arma de fogo, telas para computadores e papel para preservação de documentos históricos (ABRANTES, 2006).

A manta de celulose Bionext® (ANVISA N80255120001) é produzida pela Bionext Produtos Biológicos e o Biofill® é uma película microfibrilar de celulose pura, constituída por uma rede de fibras de celulose dispostas ao acaso (DE PAOLA; SOUZA, 1987).

Os modelos mais conhecidos fabricados *in vitro* para reposição dérmica com qualidade reprodutível são provavelmente a pele artificial desenvolvida por Yannas e Burke (YANNAS, 1980; BURKE, 1983) e desenvolvida por Bell (BELL, 1981). Ambos começam com uma matriz colagênica que, depois de transplantada, se torna vascularizada e colonizada por células vindas da superfície da ferida, pois suas

estruturas química e física funcionam como um esqueleto que permite a invasão celular, o que leva a se transformar numa pele substituta. Esses modelos já foram bem testados em ensaios clínicos, mas ainda existem problemas, como a rápida degradação proteolítica após o enxerto (WASSERMANN, 1988) ou a formação de cicatrizes nas margens da ferida e em áreas onde a derme artificial não foi perfeita. A ocorrência de uma prolongada instabilidade entre o enxerto e a cobertura epidérmica definitiva também foi um problema frequentemente relatado (DESAI, 1991; RUE, 1993).

Castro et al. (1988) avaliaram 40 pacientes que receberam a membrana de celulose como substituto temporário de pele e enfatizaram que, devido à permeabilidade seletiva, a facilidade de aderência ao leito receptor, a atoxicidade e a sua transparência (permite acompanhar a evolução da lesão), a membrana de celulose é uma alternativa eficaz para a substituição da pele.

Andreozzi et al. (1992) utilizaram a membrana de celulose em pacientes com lesões por estase venosa em membros inferiores e concluíram que a aplicação da membrana acelera a cicatrização, diminui a contaminação da ferida e reduz o custo do tratamento quando comparado às outras modalidades de tratamento.

He et al. (1997) realizaram um estudo experimental em ratos com o objetivo de estudar o efeito da membrana de CB na cura e adesão aos planos circunjacentes após secção e sutura de tendão. Os animais foram distribuídos em grupos e acompanhados por período de uma, duas, três e quatro semanas após o procedimento cirúrgico. Os autores concluíram que a membrana previne a adesão do tendão e não interfere no processo intrínseco da cicatrização do tendão.

Osman et al. (2007) utilizaram a membrana de celulose aplicada como cobertura em 133 pacientes com queimaduras de segundo grau ou dermoabrasões ou em área doadora de enxerto de pele. Concluíram que, pelas suas características, a membrana foi eficaz para recobrir lesões de pele de pouca profundidade em regiões com pouca mobilidade; foi de fácil aplicação e permitiu o reconhecimento de hematomas e/ou infecções por se tratar de uma película semitransparente; reduziu em 30% o custo do tratamento e favoreceu o retorno mais precoce do paciente às suas atividades. Outros pacientes foram tratados em regime ambulatorial e os resultados mostraram que a membrana de celulose foi efetiva na proteção da ferida do meio externo, diminuição da perda de água e eletrólitos, e na prevenção de infecção.

Aplicada sobre a ferida, a membrana de celulose adere totalmente à lesão em 48 horas, funcionando como uma substituta temporária da pele (PANERARI et al., 2008). O material possui pequenos poros, mas o suficiente para impedir a entrada de bactérias, mas grandes para que o tecido respire, filtrando totalmente os raios ultravioletas e, tal qual a pele, tem permeabilidade mínima para líquidos, o que evita o processo de desidratação e perda de sais minerais comuns nos queimados. A cobertura não precisa ser trocada, o que, no caso de queimaduras graves é uma vantagem, porque a troca retira parte do tecido recém-formado, em um procedimento doloroso que quase sempre exige anestesia geral. A cobertura protege o tecido enquanto o organismo renova a pele por baixo dele. Quando a cicatrização está concluída, a membrana de celulose resseca e cai naturalmente (MATEOS, 2004).

Algumas questões a respeito deste biomaterial necessitam maior investigação. Ainda não existem indicações claras do seu mecanismo de ação, mas acredita-se que seja promovido pela sua nanoestrutura característica, que proporciona condições favoráveis para a cura de feridas e regeneração tecidual (HOENICH, 2006). Desta forma, novos estudos se fazem necessários, pois poderão prover o entendimento de sua interação com os tecidos biológicos.

Com o objetivo de facilitar a aplicação da celulose bacteriana, Souza (2007) depositou uma patente (PI 0601330-9 A) envolvendo a produção de gel, spray-aerosol, creme e ou suspensão de CB para tratamento de lesões epiteliais. Nessa patente o autor aclama a praticidade e efetividade das coberturas obtidas, devido principalmente a fácil aplicação das mesmas.

1.6 Colágeno

O colágeno é uma proteína estável, sintetizada por células do tecido conjuntivo, denominadas fibroblastos. Por ser estável, sua renovação é muito lenta, mas o ritmo de seu *turnover* varia de um órgão para outro. Por exemplo, o colágeno dos tendões quase não é renovado, enquanto que o do conjuntivo frouxo renova-se em ritmo relativamente rápido. A deficiência de vitamina C impede a síntese de colágeno pelos fibroblastos, de modo que as fibras removidas não podem ser substituídas. A consequência é uma degeneração generalizada do tecido conjuntivo, mais acentuada nos locais onde a renovação do colágeno é mais acelerada como,

por exemplo, o ligamento que “fixa” os dentes em seus alvéolos, que apresenta uma rápida renovação de colágeno; consequentemente, esse ligamento em geral é afetado no escorbuto (JUNQUEIRA, 1990).

Estudos de culturas realizadas *in vitro* demonstram claramente que o colágeno, sendo um substrato natural para células, é altamente essencial para mantê-las com sua morfologia e fenótipo normais. Ele é a principal proteína estrutural dos tecidos dos animais vertebrados, sendo encontrada abundantemente no tecido conjuntivo, mais especificamente na pele, cartilagem, ossos, tendões e nos dentes. As diferentes propriedades destes tecidos são em parte devido ao resultado de diferentes organizações das fibras de colágeno. Sua principal característica é a formação de fibras insolúveis com alta força elástica e grande resistência à tração, sendo a função estrutural a mais importante (LEE et al., 2001). Essa proteína é depositada durante o período de crescimento do indivíduo, sua biossíntese diminui com a idade, particularmente em tecidos que passaram por pequenas modificações (KENNEDY, 1969).

Em tecidos humanos, são conhecidos, cerca de, 16 tipos de colágeno diferentes, sendo o mais abundante o tipo I presente na pele, tendão, osso e dentina; o tipo II, presente na cartilagem e o tipo III, presente na pele, músculo, vasos e frequentemente acompanha o tipo I (LEE et al., 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A natureza comum a todos estes tipos de colágeno é a estrutura de tripla hélice molecular (Figura 2), cada uma composta pela onda de três cadeias unidas que possuem junções intramoleculares e extramoleculares, que mantêm o “crosslinking” molecular, um requisito para que as fibras de colágeno possam suportar o impacto a que elas são submetidas. É importante salientar que estas fibras deixam espaço para as substâncias de preenchimento, como proteoglicanos e glicosaminoglicanos, que estabilizam as estruturas helicoidais em temperaturas entre 36°C e 48°C, além de glicoproteínas, que fazem as propriedades biomecânicas e a função de cada tecido (BERNALES et al., 2004).

Figura 2 - Estrutura do colágeno: Em A e B, microscopia eletrônica de transmissão de fibra de colágeno do tipo I. Em C, representação esquemática de fibra de colágeno composta pela subunidade tropocolágeno (D). Em E a formação em tripla hélice das subunidades do tropocolágeno. Na imagem F a composição pelos aminoácidos Glicina (Gly), Prolina (Pro) e Hidroxiprolina (Hypro) das subunidades de tropocolágeno (VULCANI, 2008).

Essa proteína tem sido um dos materiais mais utilizados na medicina para reparação do dano ou trauma químico-mecânico, da pele ou mucosas devido à sua biocompatibilidade e sua capacidade de promover cicatrização de feridas. Sua função é de apoio mecânico, sendo um componente importante da matriz

extracelular (LEE et al., 2001). O colágeno pode ser isolado, purificado em grandes quantidades e modificado (HO et al., 1997).

O colágeno tem sido empregado como biomaterial por apresentar duas características importantes tais como: seu baixo índice de alergenicidade (cerca de 2% colágeno heterólogo) que pode ser ainda reduzido pela remoção com pepsina, tornando-o altamente biocompatível (VIIDIK; VUUST, 1980; NINMI, 1988) e a capacidade de reconstituir-se através de suas preparações solúveis ou fibrilares dando origem a estruturas similares ao tecido nativo, com as mesmas propriedades deste e que são: *físico-mecânicas* (resistência, elasticidade e orientação de fibras); *físico-químicas* (permite o controle do grau de embebição por variação da densidade de reticulação associada as suas características de polieletrólito); *biológicas* (estabilidade à ação de collagenase controlada por reações de reticulação, pequena interação com plaquetas, capacidade de ativação no processo de coagulação, estimulador de crescimento de novas fibras colagênicas associadas à revascularização) (VIIDIK; VUUST, 1980).

Os biomateriais criados a partir do colágeno representam uma alternativa terapêutica com aplicação variada na área médica e odontológica, já que apresenta grande biocompatibilidade e capacidade de promover a cura de feridas. Na área biomédica, tem sido utilizado para a reparação da parede abdominal, tendão, ligamento, reparação de feridas, entre outros (BERNALES et al., 2004; COSTA; VEINSTEN, 2008). Os materiais a base de colágeno são obtidos de várias espécies de animais, o que requer diferentes técnicas de conservação para preservar a sua viabilidade e diminuir a sua antigenicidade. Esta preservação tem sido feita por congelamentos ou agentes químicos como soluções mercuriais, ácido acético glacial, ácido peracético e glicerina (VULCANI et al., 2008).

Até a década de 80, o emprego de colágeno era restrito à produção de fios cirúrgicos, quando teve um aumento considerável em aplicações mais nobres que vão desde o revestimento de próteses vasculares até o suporte para orientação do crescimento celular (BURET, 1991).

No novo conceito de biomateriais, estes não devem servir apenas para o preenchimento de espaços, mas também devem estimular uma resposta biológica quando implantados. Em virtude dessas propriedades, o colágeno possui uma posição privilegiada como biomaterial em diversas aplicações como, reconstrução de tecidos moles (CHEN et al., 2000), revestimento de queimaduras e outras lesões

(TABATA, 2000), suporte para crescimento de nervos periféricos, orientador de tecidos em desenvolvimento e como agente hemostático. Além do que, pode ser utilizado sob diversas formas como membranas, esponjas, géis, pós, filmes, tubos, etc (MA; ZHANG, 1999).

Em tecidos normais, o colágeno fornece a força, a integridade e a estrutura. Quando os tecidos são rompidos após a lesão, o colágeno é necessário para reparar o defeito e restabelecer a estrutura anatômica e a função. O colágeno tem sido um dos materiais mais utilizados na medicina para reparação do dano ou trauma químico-mecânico, da pele ou mucosas devido à sua biocompatibilidade e sua capacidade de promover cicatrização de feridas. Sua função é de apoio mecânico, sendo um componente importante da matriz extracelular (PÉRTILE, 2007). O colágeno reconstituído tem sido aplicado em uma variedade de problemas cirúrgicos, incluindo hemostasia, queimadura e revestimento de feridas, regeneração nervosa, reconstrução tecidual, cirurgia do trato urinário e reparação de hérnias. Ele também tem sido aplicado em sistema de liberação de drogas, barreira vaginal contraceptiva, válvulas cardíacas e enxertos vasculares (GIRARDI, 2005).

A necessidade de *scaffolds* à base de colágeno para adesão e manutenção das células-tronco embrionárias ou adultas é de grande importância, visto que no mercado são poucos os produtos disponíveis, como por exemplo, o Verax[®], que se encontra na forma de microesponjas e podem ser utilizadas como carreador e imobilizador destas células até o local de sua necessidade (DEAN et al., 2003).

Algumas membranas de colágeno são obtidas a partir de tecidos de cadáver humano ou animal, principalmente de origem bovina e suína. São os diferentes tipos de membranas de colágeno, que atualmente têm a maior série de casos de sucesso relatados. Elas resistem à pressão exercida pelos tecidos durante a cicatrização e a escolha deve-se a biocompatibilidade deste material, além das características biológicas como biodegradabilidade, propriedades hemostáticas e a baixa antigenicidade (LEE et al., 2001; ORÉFICE et al., 2006). Vulcani et al. (2008) afirmam que a composição química de uma membrana biodegradável determinará não somente a longevidade, mas também a resposta inflamatória e imune.

Uma membrana ideal deve ser elástica, flexível e suave, ainda que forte para que não sofra rupturas provocadas pelos movimentos dessas regiões mucoides, devendo igualmente apresentar uma adequada força bioadesiva e o grau de

intumescimento não deve ser excessivo de forma a evitar desconforto (SALAMAT-MILLER et al., 2005).

As membranas a base de colágeno possuem como vantagem clínica a não necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica, pois esse material é degradado lentamente por agentes químicos (em torno de 12 meses) e não causa reações teciduais agressivas (GOTTLOW et al., 1994; CAIAZZA et al., 2000; ROSSI Jr. et al., 2010). Contudo, Fugazzotto (2003), constatou que quando não fixadas, estas membranas permitem movimentos e reabsorção que provocam o rompimento na superfície do coágulo, levando ao desenvolvimento de tecido mole entre a membrana e o coágulo rompido.

A matriz de colágeno, previamente preparada em soluções alcalinas, é usada, por exemplo, no reparo cirúrgico da parede abdominal de equinos (VULCANI et al., 2008).

O uso de membranas de colágeno é relatado para regeneração óssea guiada onde a membrana impede que os tecidos circunjacentes invadam o defeito ósseo e atrasem ou impeçam a consolidação da formação óssea (ROSSI Jr. et al., 2010). Segundo Santos (2010), a membrana de celulose apresenta qualidades compatíveis para uso como barreira para a regeneração óssea guiada, enquanto que a membrana de colágeno seria utilizada para recobrimento.

Inconveniências no tratamento foram relatados por Pitanguy et al. (1988) e Mayall et al. (1990) tais como a necessidade de remoção de bolhas de ar sob a membrana, remoção de exsudato, a dificuldade de adesão a área receptora, enrugamento e desprendimento, bem como a elasticidade que é desejada para tratamento de lesões em áreas de articulação.

Materiais derivados do colágeno, proveniente de submucosa do intestino delgado de porcos, têm sido usados com resultados promissores em reparos experimentais da parede abdominal. Eles também têm sido avaliados como biomaterial para uma variedade de outras aplicações em reparos teciduais ou substituição, incluindo o reparo de tendões e bexiga urinária (CUNHA et al., 2005).

Hart et al. (2002) estudaram um dispositivo de celulose regenerada oxidada (ORC)/colágeno[®] quanto a sua habilidade de promover migração de fibroblastos e proliferação celular *in vitro* e acelerar a cicatrização de ferida no rato diabético, que é um modelo de cura de ferida atrasada. Eles observaram que o tratamento acelerou significativamente o fechamento da ferida diabética e resultou em uma melhoria

mensurável na condição histológica de tecidos da ferida. Desta forma os autores concluíram que o ORC/collagen[®] inativava os fatores potencialmente prejudiciais como proteases, radicais livres de oxigênio e íons metálicos em excesso presentes no fluído da ferida crônica.

Segundo Sanino et al. (2009), hidrogéis são redes poliméricas macromoleculares, de estrutura hidrofílica com capacidade de absorver e liberar água em resposta às condições ambientais. A quantidade de água retida na malha da rede do hidrogel pode ser definida pela estrutura da rede do polímero e por outros fatores, tais como temperatura, pH e força iônica da solução de água no contato com o polímero.

Em comparação com as redes poliméricas hidrofóbicas, como aquelas baseadas em ácido láctico ou poli (ácido láctico-ácido glicólico), que apresentam uma baixa capacidade de absorção de água, os hidrogéis fornecem uma série de propriedades únicas que constituem vantagens para seu uso em biomedicina. Aplicações, tais como a capacidade de encapsular biomacromoléculas, incluindo as proteínas e o DNA (KASHYAP et al., 2005).

O gel de colágeno é utilizado como suporte para a reconstrução de tecidos moles em defeitos de natureza traumática ou estética, na correção da incontinência urinária, no aumento de volume de cordas vocais e correção precoce de miopia pelo espessamento da parede escleral. Sua grande vantagem é a eliminação das técnicas cirúrgicas invasivas. Os géis apresentam um comportamento viscoelástico, resultante do entrelaçamento das fibrilas, que é importante tanto para facilitar a extrusão pela agulha, quanto para a manutenção dos contornos necessários frente às pressões resultantes do tecido adjacente pós-implante. Outra característica importante nestes géis é a sua biodegradabilidade, cujo controle garante o crescimento eficiente do novo tecido à medida que é biodegradado (GOISSIS; GÓES, 1997).

Atualmente hidrogéis ocupam posição de destaque em biotecnologia, em função de suas aplicações. Em geral, hidrogéis são biocompatíveis e podem ser aplicados para liberação controlada de medicamentos, implantes terapêuticos, cultura de células, etc. Tecnicamente, hidrogel é um material constituído de redes poliméricas tridimensionais hidrofílicas com habilidade de absorver e reter grande quantidade de água. A água e os poros no interior do hidrogel permitem a difusão seletiva de solutos através da membrana (VILELA, 2010).

Os géis comerciais Intrasite gel[®], Dermagran[®], Duoderm gel[®], Hydrosorb[®], Hydrosorb Plus, Hypligel[®], Nu-Gel[®], Elasto-gel[®] e Purilon[®] podem apresentar-se sob a forma de gel transparente, amorfo ou placa. As placas são geralmente compostas por água, propilenoglicol e carboximetil celulose, ou água e polivinilpirrolidona. Existem ainda os hidrogéis que possuem associação com alginato, o que lhes confere capacidade de maior poder de absorção e desbridamento químico, indicados para feridas com tecido necrótico e com tecido desvitalizado. Suas indicações são: feridas secas ou com pouco exsudato; feridas com necrose, pois auxilia na remoção de crostas; feridas limpas; feridas superficiais, como lacerações, cortes e abrasões; áreas doadoras e receptoras de enxerto; úlceras diabéticas e úlceras de pressão; úlceras em mmii (úlceras de membros inferiores); queimaduras de primeiro e segundo graus. Sua ação está relacionada com a quimiotaxia de leucócitos; favorecimento em relação à angiogênese; promoção do desbridamento autolítico e manutenção do meio úmido ideal. Os benefícios estão relacionados com a possibilidade de uso nas várias fases da cicatrização; não danifica o tecido de granulação; além de promover alívio e conforto. As limitações são: não deve ser utilizado em feridas cirúrgicas fechadas, feridas com muito exsudato ou colonizadas por fungos e nem sobre a pele íntegra; pode causar maceração do tecido adjacente; requer troca em intervalos que variam de 12 a 24 horas (MANDELBAUM et al., 2003).

1.7 Pomada de Colagenase

Na degradação do colágeno estão envolvidas várias enzimas, no entanto as principais são as enzimas chamadas colagenases, que são especializadas em hidrolisar o colágeno. As colagenases pertencem à família das enzimas chamadas metalproteinases da matriz (MMPs), essas formam uma grande família de enzimas zinco dependentes responsáveis pela degradação do tecido conjuntivo. Recentemente foi demonstrada sua ação em momentos de modelação e remodelação óssea (ALVES, 2002). Essas colagenases podem ser produzidas por diversos tipos celulares, entre elas estão os fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e osteoclastos, bem como por algumas bactérias que estão presentes na cavidade oral, como a *Porphyromonas gingivalis* (WANG; MCNEIL, 1998).

A collagenase é uma enzima que tem por substrato o colágeno nativo e desnaturalizado, o principal constituinte (75% do peso seco) da pele. Pode ser extraída do meio de cultivo do *Clostridium histolyticum* sendo utilizada para remover os restos celulares e extracelulares do tecido necrosado. Contribui para a neoformação de tecido e reepitelização das úlceras e escaras dérmicas sendo que o colágeno do tecido sadio ou neoformado não é atacado pela collagenase. Apresenta-se como creme, pomada ou unguento estéril para aplicação tópica com 250U por grama (MATOS, 2008).

Essa enzima digere exclusivamente o colágeno tipo III, não atacando, portanto, outras proteínas e é ativa no pH normal dos tecidos (pH em torno de 7) (JUNQUEIRA, 1990).

De forma geral, os compostos enzimáticos, sob a forma de pomadas ou cremes, são utilizados em muitos tipos de coberturas, mas seu papel mais efetivo tem sido o de auxiliar no desbridamento das lesões. Há grande controvérsia quanto à sua ação como potencializador do processo de reparação, como se acreditava até alguns anos. A maioria dos autores concorda que o uso de formulações combinadas de enzimas e antibióticos tópicos não são recomendáveis, pois elas não apresentam efetividade no controle da infecção e com frequência levam ao aparecimento de resistência. A collagenase e a fibrinolisinase são enzimas que agem de forma seletiva, promovendo o desbridamento enzimático de forma suave, sobre os tecidos desvitalizados. (MANDELBAUM et al., 2003).

Nos grupos experimentais do estudo de Yamada et al. (2009), foram observados sinais de processo inflamatório, tais como aumento de temperatura, aumento de volume e sensibilidade dolorosa local.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo analisar de forma macroscópica e histológica coberturas à base de celulose bacteriana e colágeno, na forma de membrana ou hidrogel e comparar com pomada à base de colagenase, após a aplicação sobre as feridas confeccionadas no dorso de ratos. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Obtenção de coberturas estruturalmente formadas por celulose bacteriana sintetizada por *Gluconacetobacter xylinus* e colágeno tipo I, na tentativa de gerar biomateriais com propriedades análogas à estrutura da pele;
- Realizar caracterizações físico-químicas para melhor compreensão da interação do colágeno a celulose bacteriana;
- Avaliar a potencialidade destes biomateriais para a reparação tecidual;
- Análise do estudo *in vivo* para analisar a biocompatibilidade, a eficiência e o comportamento de reabsorção das membranas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da Membrana e do Hidrogel de Celulose Bacteriana Contendo Colágeno e da Pomada de Collagenase

3.1.1 Membranas de CB-COL

As mantas de celulose bacteriana foram fornecidas pela empresa Fibrocel – Produtos Biotecnológicos LTDA, situada em Ibiporã (PR). Foram utilizadas matrizes de celulose bacteriana altamente hidratadas, com 5 mm de espessura e 25 mm de diâmetro (Figura 3). As membranas de CB-COL foram preparadas no Laboratório de Materiais Fotônicos do Instituto de Química da UNESP – Campus de Araraquara, sob responsabilidade do Prof. Dr. Sidney José de Lima Ribeiro e colaboração da Dra. Sybele Saska.

Figura 3 - Celulose bacteriana de 5 mm de espessura padronizadas em 25 mm de diâmetro (SASKA, 2011).

No preparo destas amostras, empregou-se solução de colágeno tipo I, extraído do tendão bovino tratado em hidrólise alcalina por 24 h, no qual foi preparado e cedido pelo Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química da USP de São Carlos.

As membranas foram preparadas de acordo com a metodologia previamente descrita por Saska (2012). Para a realização do processo de incorporação do colágeno, primeiramente foi realizada a troca da água da celulose bacteriana por dimetilformamida (DMF). Esta troca foi realizada por meio de filtração a vácuo em filtro de placa porosa. Depois de completa a troca, realizou-se a modificação da

superfície da celulose bacteriana pela esterificação de Fmoc-glycine (Fmoc-Gly) (Advanced Chem Tech®) às hidroxilas livres da celulose. Esta reação de esterificação entre os grupos OH da celulose bacteriana e os grupos carboxila (COOH) do aminoácido foi realizada no intuito de disponibilizar grupos de maior potencial nucleofílico, aumentando a eficiência de ligação com os grupos carboxílicos do colágeno.

Para a reação de esterificação foram utilizados os seguintes reagentes: 238 mg de Fmoc-Gly; 162 mg de 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI) (Sigma®); 127 µL N-metilimidazol (NMI) (Fluka®) em 8 mL de DMF. O tempo de acoplamento foi em média de 2 horas a temperatura ambiente. Após a reação, foram realizadas várias lavagens com DMF e posterior imersão em DMF por 24 horas para remoção completa do excesso dos reagentes.

A análise quantitativa por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis) foi utilizada para determinar o grau de incorporação de Fmoc-Gly aos grupos OH da celulose bacteriana utilizando um aparelho Shimadzu UV1601-PC. A absorbância das amostras foi medida empregando um comprimento de onda de 290 nm.

Para realizar estas medidas, pequenas frações de CB/Fmoc-Gly foram pesadas e em seguida tratadas com piperidina 20% (v/v), em uma cubeta de quartzo (10 x 10 mm) após agitação prosseguindo-se com a leitura da absorbância, contra um branco onde se omitiu a amostra.

Após este procedimento, foi realizada a desproteção dos grupos α -amínicos empregando uma solução de piperidina 20% (v/v) por 2 horas à temperatura ambiente. Decorrida a desproteção, sucessivas lavagens com DMF foram realizadas para remoção do excesso da solução de piperidina, seguido de lavagens com DMF e posterior lavagens sucessivas com água deionizada para a troca de solventes e proceder à incorporação de colágeno à matriz de celulose bacteriana.

Para isso, empregou-se uma solução de colágeno tipo I (4 mg.mL^{-1}) e 5 mmol.L^{-1} de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) em 10 mL de água deionizada. Posteriormente os cilindros de CB/Gly foram imersos nesta solução ajustando-se o pH inicial em 6,0 com NaOH $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ mantendo-o nesta condição por 24 horas a 4°C , sob agitação. Decorrido o período, as amostras foram lavadas com água deionizada a vácuo para remoção do excesso de colágeno e EDC. As amostras de CB-COL foram secas em molde prensado a 34°C e acondicionadas em envelopes apropriados para serem esterilizadas com radiação gama a 20 kGy.

3.1.2 Hidrogel de CB-COL 8%

A amostra do hidrogel foi preparada com a esterilização de todos os materiais utilizados.

As mantas de celulose bacterianas hidratadas (99% água), obtidas sob cultivo, foram trituradas em um elemento dispersor de alta rotação do tipo Ultra Turrax, em meio aquoso. Assim, foi obtida uma suspensão formada de partículas de celulose bacteriana.

Essa suspensão foi submetida a uma peneira, malha 37 mash, para a retirada de água, restando apenas uma pasta formada pelas micropartículas da celulose bacteriana.

A formulação foi preparada através da mistura dos reagentes por um agitador mecânico. Estas substâncias foram doadas pela Farmácia de Manipulação Magistral de São Carlos. O Natrosol (Hidroxietilcelulose), que dá a consistência de gel e o solvente Propilenoglicol, foram produzidos pela Pharma Nostra. O conservante Nipagin® foi produzido pela Henri Farma.

Inicialmente solubilizou-se o Nipagin® em propilenoglicol, a quente e sob agitação manual. Assim, os mesmos foram vertidos no béquer que já continha a pasta de celulose sob agitação mecânica. Em seguida, o Natrosol foi adicionado aos poucos para dar a consistência de gel. Finalmente, o colágeno e a água foram adicionados. As quantidades exatas das matérias-primas utilizadas para a produção de 100 g do hidrogel são descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração das matérias-primas usadas na formulação do hidrogel (%).

Reagentes	Hidrogel (%)
Nipagin	0,20
Propilenoglicol	5,00
Natrosol	3,00
Colágeno	8,00
Celulose Bacteriana	10,00
Água deionizada q.s.p.	73,80

3.2 Caracterização das Micropartículas do Hidrogel de CB-COL e do Colágeno Puro

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pode ser utilizada para fornecer informações sobre tamanho, forma e arranjo das partículas da amostra e a relação entre elas numa escala nanométrica; informações cristalográficas (grau de cristalinidade das amostras); aplicações biológicas e seus efeitos; obtenção de imagens tridimensionais com alta profundidade. A ampliação de MEV pode ser controlada ao longo de um intervalo de até seis ordens de grandeza a partir de 10 a 500.000 vezes. Esta é uma técnica poderosa e amplamente utilizada para capturar estrutura de "rede" na característica de hidrogéis (AZEVEDO, 2006; EI FRAY et al., 2007).

As micrografias foram realizadas para verificar os níveis de alteração da estrutura microfibrilar nas amostras liofilizadas do hidrogel de CB-COL e do colágeno. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas no microscópio eletrônico modelo JEOL/EO - JSM-6610 da Faculdade de Odontologia da Unesp de Araraquara. As amostras foram colocadas em um suporte, porta-amostras metálicas de cobre, e foram recobertas com uma camada de carbono com espessura de 10 nm em um metalizador Balsers modelo SDC 050. As micrografias foram realizadas sob tensão de 15 Kv.

3.2.2 Análise Termogravimétrica (TG)

A termogravimetria (TG) é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa de uma amostra em função do tempo (com a temperatura constante) ou em função da temperatura.

As curvas de TG foram obtidas a partir de um equipamento TA-Instruments usando uma célula SDT Q600. As amostras do hidrogel de CB-COL e colágeno foram aquecidas em cadinho de alumina de 25°C a 800°C sob atmosfera de nitrogênio com fluxo contínuo de 100 mL.min⁻¹ com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹. Foram pesados em média 3 mg de cada amostra, utilizando-se cadinho de alumina como referência.

A Termogravimetria Diferencial (DTG) é uma técnica que fornece a primeira derivada da curva TG, em função do tempo ou da temperatura. A curva DTG apresenta esta informação numa forma que seja mais visualmente acessível, visto que as curvas do DTG não contêm mais informações do que as curvas de TG. A DTG indica exatamente as temperaturas do começo, da taxa máxima e a temperatura do final da mudança.

Segundo Saska (2011), a porcentagem residual em 600°C para as amostras de CB-COL antes e após a esterilização foi ao redor de 31%. Desta forma, com esta análise, pôde-se confirmar que o conteúdo de colágeno incorporado à CB foi padronizado, com valor ao redor de 8%, quando descontada a porcentagem residual da CB pura (23%).

3.2.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica útil para a identificação da estrutura química de uma substância. Baseia-se no princípio de que os componentes básicos de uma substância, ou seja, as ligações químicas, geralmente podem ser animadas e absorvem a luz infravermelha em frequências que são típicas dos tipos de ligações químicas (TORRES et al., 2003; MANSUR et al., 2004). Esta técnica foi utilizada para investigar o arranjo estrutural do hidrogel de CB-COL comparando com as outras amostras (colágeno puro e CB).

A espectroscopia na região do infravermelho é utilizada na confirmação da presença e da integridade do colágeno da matriz, por meio da relação A1235/1450, pois enquanto a intensidade da banda medida em absorvância em 1235 cm^{-1} reflete a integridade da tripla hélice (amida III), a banda em 1450 cm^{-1} (deformação C-H) apresenta valores constantes e independentes da estrutura da proteína (GILBERT et al., 1988; GIRARDI, 2005).

As principais atribuições que caracterizam a celulose são: ~3450 cm^{-1} - estiramento OH; ~2900 cm^{-1} - estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico CH_2 ; 2700 cm^{-1} - estiramento simétrico CH_2 ; 1645 cm^{-1} - deformação OH; 1432 cm^{-1} - deformação CH_2 ; ~1370 cm^{-1} - deformação CH_3 ; ~1332 cm^{-1} - deformação OH e na região de 1320-1030 cm^{-1} - deformação CO (SASKA, 2011).

Os espectros de FT-IR foram obtidos no espectrômetro FT-IR, modelo Spectrum 2000 da Perkin Elmer, sob as seguintes condições: porcentagem de transmitância (%T) com um acúmulo de 64 varreduras, com resolução de 1cm^{-1} , na faixa de absorção de $4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. As respectivas amostras liofilizadas foram previamente pesadas, trituradas e diluídas em KBr na proporção 1:100 para a confecção das pastilhas.

3.2.4 Difratometria de raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raios-X foram utilizados para determinar a estrutura cristalina do hidrogel de CB-COL, do colágeno tipo I puro e da CB. Foram obtidos usando um difractômetro Siemens Kristalloflex, com um filtro de níquel e radiação de Cu ($K\alpha$), com varredura angular entre 4° a 70° com passo de $0,02^\circ$ (2θ) e tempo de aquisição de contagem de 3 s para cada amostra. As amostras foram fixadas sobre um suporte de vidro. A identificação das fases cristalinas da celulose foi realizada comparando-se os dados obtidos com as fichas cristalográficas, padrões da base de dados ICDD – PDF - 2 (International Centre for Diffraction Data – Power Diffraction File-2).

3.3 Experimentação Animal

O estudo constitui de 32 ratos (*Rattus Norvegicus Holtzman*), machos, adultos, pesando em média 200 g. Os ratos passaram por aclimatização às condições laboratoriais. Foram avaliados 8 animais/grupo (contendo 4 animais por período).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus da Unesp de Araraquara (CEP/FCF/CAr nº 16/2011), no qual o protocolo encontra-se em anexo.

O procedimento de anestesia foi realizado com administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/kg). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob rigoroso protocolo asséptico (Figura 4).

Figura 4 - Bancada com os materiais esterilizados para o início dos procedimentos cirúrgicos.

Após tricotomia e assepsia da região dorsal foram realizadas, em cada animal, duas incisões com bisturi circulares criando feridas de aproximadamente 6 mm de diâmetro, com uma distância de 2 cm entre elas (Figura 5). O grupo I, a ferida recebeu a cobertura de membrana de celulose bacteriana com colágeno (CB-COL) fixada com dois pontos e o grupo II, a ferida foi preenchida com coágulo sanguíneo. O grupo III, a ferida recebeu o hidrogel de CB-COL e no grupo IV, foi aplicada a pomada a base de collagenase (Tabela 2). Os grupos III e IV receberam a sua respectiva cobertura diariamente.

Figura 5 - Identificação das regiões das lesões criadas no dorso dos ratos.

Tabela 2 - Distribuição dos grupos em relação ao material utilizado.

Grupos	Material utilizado
G I	Membrana CB-COL
G II	Coágulo
G III	Hidrogel CB-COL
G IV	Pomada de collagenase

Foi utilizada a pomada a base de collagenase (Kollagenase) do laboratório Cristália, seguindo o protocolo do fabricante.

Posteriormente os animais foram devidamente transferidos para gaiolas isoladas e identificadas, e a recuperação foi acompanhada diariamente, com as devidas condições de alimentação, água e higiene. Os ratos foram mantidos num ambiente com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), a umidade (60-70%) e iluminação (12 horas de luz/escuridão ciclos), controladas. Foi administrado como analgésico pós-operatório o fármaco Tramadol, na dosagem de 12,5 mg/kg, em dose única por via intraperitoneal, segundo Cannon et al. (2010).

A eutanásia dos animais ocorreu nos períodos de 3, 7, 15 e 30 dias de pós-operatório, com quatro animais para cada período, correspondente às repetições de cada condição experimental. O procedimento foi realizado, primeiramente, por meio de anestesia geral com a administração intramuscular de cloridrato de ketamina (25 mg/kg) e de cloridrato de xilazina (5 mg/Kg) e após remoção das lesões cicatrizadas, foi realizado o aprofundamento anestésico, e em seguida, as peças foram fixadas em solução de formol 10% (Figura 6). Em seguida, o material foi encaminhado para o processamento histológico de rotina para coloração em hematoxilina-eosina (HE).

Figura 6 - Bancada com os materiais para o início da retirada das lesões cicatrizadas para a confecção das lâminas.

3.4 Avaliação Macroscópica

As feridas foram avaliadas macroscopicamente após os períodos de 3, 7, 15 e 30 dias. A avaliação das lesões foi realizada através de medição do diâmetro da área afetada utilizando um paquímetro digital (Figura 7), logo após o procedimento de anestesia pré-eutanásia. Foram observadas as diferenças entre as lesões mantidas por coberturas de membrana e hidrogel de CB-COL e os grupos controles, pomada a base de collagenase e coágulo sanguíneo, sendo que estas medidas foram tabuladas e analisadas estatisticamente.

Figura 7 - Paquímetro digital utilizado para medir o diâmetro das lesões.

As análises estatísticas entre os grupos foram realizadas para os períodos de 3, 7 e 15 dias, utilizando o programa BioEstat 5.3. Para análise de normalidade foi empregado o Teste de Lilliefors. Devido os dados serem apresentados como paramétricos, o teste de ANOVA foi realizado para avaliar os valores mensurados na respectiva análise descrita acima. O pós-teste empregado para a comparação entre médias foi o Teste t (LSD). O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

A avaliação macroscópica avaliou também a presença de eritema (vermelhidão da pele) próxima à região da lesão, presença excessiva de exsudato na ferida e se a cobertura mantinha a umidade da lesão.

3.5 Análise Histológica

Após eutanásia, as regiões lesionadas do dorso foram removidas, fixadas em solução de Bouin por 48 horas e processadas segundo técnica rotineira para inclusão em parafina, onde foram realizados cortes semi-seriados de 6 μ m, no sentido longitudinal da pele e posteriormente corados em Hematoxilina-Eosina (HE).

Para cada um dos animais, foram feitas oito lâminas contendo 6 cortes em cada uma delas e posteriormente foram feitas as suas análises.

Foi utilizado para a análise e fotografia das lâminas o microscópio (Olympus X51), com um aumento de 12.5 x, acoplado à câmera digital (Olympus DP71 - 12.5 MPixels), e o software Leica Application Suite, pertencentes ao Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

A resposta normal no processo cicatricial é um fenômeno dinâmico, no qual as células e seus produtos interagem para reparar o tecido danificado. Muitas células estão envolvidas nesse processo reparativo, incluindo macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. A observação da distribuição dessas células pode ser usada para descrição da reação inflamatória (VINCE et al., 1991). A análise para o grau de inflamação seguiu as normas da ASTM F981-04, que são apresentadas a seguir na Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação para intensidade de reação inflamatória presente nos espécimes.

Classificação	Escore
Sem reação	0
Grau leve	1
Grau médio	2
Grau moderado	3
Grau severo	4

Fonte: Norma da ASTM F981-04.

Os dados que se referem ao grau de inflamação (classificações e os seus respectivos scores) e ao padrão de reparação do tecido (em relação à qualidade, quantidade e orientações das fibras colágenas, e também em relação à reconstituição do epitélio), dos grupos tratados e controles, nos diferentes períodos, foram apresentados em tabelas de contingência e sua associação estruturada foi analisada estatisticamente. O nível de significância adotado foi de 5%.

Foi realizada também a avaliação do padrão de reparação tecidual em relação à qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas, e também em relação à reconstituição do epitélio. Essas análises, para o grau do padrão de reparação tecidual, são apresentadas a seguir nas Tabelas 4 e 5.

As análises estatísticas da reação inflamatória entre os grupos foram realizadas para os períodos de 3, 7 e 15 dias, utilizando o programa BioEstat 5.3. Para análise de normalidade foi empregado o Teste de Lilliefors. Devido os dados apresentados serem não-paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar os valores mensurados na respectiva análise descrita acima. O pós-teste empregado para a comparação entre médias foi o Teste de Dunn. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

Tabela 4 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à qualidade, quantidade e orientação das fibras colágenas presentes nos espécimes.

Classificação	Escore
Ausência	0
Presença - fibras desorganizadas	1
Presença - pouco organizadas	2
Presença - organização média	3
Presença - bastante organizada	4

Tabela 5 - Classificação para o padrão de reparação tecidual em relação à reconstituição do epitélio presentes nos espécimes.

Classificação	Escore
Não reparado	0
Em processo de cicatrização	1
Reparado	2

As análises estatísticas da reparação tecidual entre os grupos foram realizadas para os períodos de 3, 7 e 15 dias, utilizando o mesmo programa BioEstat 5.3. Para análise de normalidade foi empregado o Teste de Lilliefors. Devido os dados apresentados serem paramétricos, o teste de ANOVA foi realizado para avaliar os valores mensurados na respectiva análise descrita acima. O pós-teste empregado para a comparação entre médias foi o Teste de Dunnett. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

As análises estatísticas da quantidade e qualidade das fibras colágenas entre os grupos foram realizadas para os períodos de 3, 7 e 15 dias, utilizando o mesmo programa BioEstat 5.3. Para análise de normalidade foi empregado o Teste de Lilliefors. Devido os dados serem apresentados como não-paramétricos, o teste de

Kruskal-Wallis foi realizado para avaliar os valores mensurados na respectiva análise descrita acima. O pós-teste empregado para a comparação entre médias foi o Teste de Dunn. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das Micropartículas do Hidrogel de CB-COL e do Colágeno Puro

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Figura 8 refere-se às micrografias do colágeno puro e do hidrogel de CB-COL 8% liofilizados. As imagens (c) e (d) da Figura 8 apresentam um material poroso característico de um hidrogel. As micrografias mostram uma estrutura constituída de arranjos de fibras aleatoriamente dispostos, mas compactos em alguns pontos. As fibras não têm uma morfologia regular e parecem “fundidas” entre si nos locais mais compactos (Figura 8).

Para o hidrogel de CB-COL, verifica-se que com a presença de colágeno, a estrutura continua sendo porosa e os poros estão interconectados em todo o material em três dimensões, o que é extremamente importante na engenharia de regeneração tecidual, como por exemplo, para o crescimento de fibroblastos (O'BRIEN et al., 2005).

Figura 8 - Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura para colágeno (a) e (b) e para o hidrogel de CB-COL (c) e (d). As imagens (b) e (d) são os cortes transversais das amostras.

4.1.2 Análise Termogravimetria (TG)

Na análise termogravimétrica, a variação da massa de uma amostra em atmosfera controlada é continuamente acompanhada em função do tempo ou temperatura. O gráfico de peso ou porcentagem em peso em função do tempo é chamado de curva termogravimétrica (WENDLAND, 1986).

A amostra é aquecida a uma temperatura constante até que haja uma variação da massa. Nesse momento, a temperatura pára de aumentar até que haja a estabilização da massa. Com isso, a temperatura volta a aumentar até a próxima mudança da massa. A Figura 9 apresenta as curvas termogravimétricas obtidas na razão 10°C/min de aquecimento para o colágeno (a), hidrogel de CB-COL (b) e celulose bacteriana (c).

Para as amostras, são observados três estágios, atribuídos à:

- I - Perda de água;
- II - Perda por decomposição;
- III - Carbonização.

As curvas termogravimétricas das amostras de colágeno e do hidrogel de CB-COL mostraram que no estágio II, a perda de massa ocorre na mesma temperatura (325°C), já a curva que representa a CB mostrou que a perda referente a esse mesmo estágio se dá a 355°C.

Observou-se também que ao final do estágio I, as curvas que representam o hidrogel de CB-COL e a CB apresentaram uma menor perda de massa nesse estágio se comparado à curva referente ao colágeno.

O estágio III, que é referente à carbonização das amostras se deu em torno de 370°C.

A curva em cor vermelha (DTG), nos gráfico da Figura 9, representa a primeira derivada da curva TG (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009). O pico corresponde ao evento de maior perda de massa que ocorreu durante todo o processo de aquecimento de cada amostra.

As curvas TG/DTG indicam que as amostras apresentam excelentes propriedades térmicas, e que não houve mudança significativa na estabilidade térmica entre elas.

Figura 9: Curvas TG (----) e DTG (----) de: (a) colágeno puro; (b) Hidrogel de CB-COL; (c) celulose bacteriana. I – perda de água, II – perda por decomposição e III - carbonização.

4.1.3 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

A Figura 10 apresenta espectros de infravermelho para as amostras liofilizadas do gel de CB-COL, do colágeno puro e da celulose bacteriana.

A integridade da estrutura do colágeno pode ser verificada quando a razão entre os valores das absorvâncias relativos aos números de onda 1450 e 1235 respectivamente for próximo ou igual a 1 (GEORGE, 1991). Nesta dissertação, a relação obtida foi 1 para o hidrogel de CB-COL (Tabela 6), mostrando que a estrutura secundária (hélice tripla) foi preservada durante o processo de extração do colágeno e quando adicionado à celulose bacteriana. Se o valor ficar bem longe do valor unitário, o colágeno pode ter virado gelatina, o que não é interessante para o objetivo do trabalho.

Tabela 6: Valores das absorvâncias associados aos números de onda 1450 e 1235 do hidrogel de CB-COL.

<i>Número de onda (λ)</i>	<i>Valores das absorvâncias</i>
1450	1,1755
1235	1,1690

De acordo com os valores da tabela acima podemos encontrar o resultado da razão entre os valores de absorvância referentes aos números de onda ($1,1755/1,1690=1,005$).

As amostras de CB e do hidrogel de CB-COL apresentaram bandas típicas para proteínas em torno de 1656 e 1547 cm^{-1} , referentes ao estiramento C=O amida I e deformação N-H para amida II, respectivamente. Esta banda não foi observada no espectro do colágeno puro.

Observou-se na amostra do hidrogel de CB-COL e do colágeno puro que a intensidade da banda $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ é consideravelmente menor em relação à amostra de CB, sugerindo a interação da glicina com a CB.

O alargamento das bandas foi verificado na amostra do hidrogel de CB-COL, podendo estar relacionado à formação de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da CB (CHEN et al., 2008).

Figura 10: Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho de: (a) hidrogel de CB-COL; (b) colágeno puro; c) celulose bacteriana.

4.1.4 Difractometria de raios-X (DRX)

Os difratogramas de raios-X das membranas do hidrogel de CB-COL, do colágeno tipo I puro e da CB estão representados na Figura 11. Os picos para CB foram identificados como celulose nativa (PDF#50-2241 ICDD, PDF-2, *International Centre for Diffraction Data, Power Diffraction File-2*) e os picos característicos observados em $2\theta = 15^\circ$ e $22,5^\circ$ (BARUD et al., 2008). Os picos da difração em $2\theta = 15^\circ$ e $22,5^\circ$ são característicos da celulose. O padrão de DRX para o colágeno mostrou picos em torno de $2\theta = 5^\circ - 20^\circ$, o qual é típico padrão de DRX de colágeno puro, mostrando ser um polímero bastante amorfo (ZHANG et al., 2004). No padrão do DRX do hidrogel de CB-COL não se observou o aparecimento de grandes picos ao redor de $14^\circ - 16^\circ$, sugerindo que a incorporação do colágeno não afetou a cristalinidade da CB principalmente nessa região. Além disso, houve uma diminuição na intensidade dos picos da CB. Esta diminuição também pode estar relacionada à presença do colágeno inserido à estrutura de CB.

Figura 11 - Padrões de difração de DRX do hidrogel de CB-COL (a); colágeno puro (b); CB (c) com os seus respectivos picos assinalados.

4.2 Avaliação Macroscópica

Neste trabalho, coberturas de membrana de celulose bacteriana foram implantadas no subcutâneo de ratos, e sua biocompatibilidade *in vivo* foi avaliada. Os implantes de celulose bacteriana não causaram reação de corpo estranho, não

apresentaram formação de fibrose ou encapsulamento, e o tecido conjuntivo dos ratos apresentou-se muito bem integrado às estruturas de celulose bacteriana. Após semanas do implante, o processo de remodelamento prosseguiu e os fibroblastos estavam completamente integrados, onde se observou a síntese do colágeno.

O hidrogel de CB-COL foi de fácil aplicação e aderiu sem dificuldades o leito da lesão. A aplicação da pomada de collagenase foi um pouco mais difícil e demorada, pois não teve uma boa aderência no leito da ferida. Quando era retirada a pá de aplicação, a pomada vinha junto e não ficava na lesão. A membrana demonstrou ser um material de manuseio fácil, com textura semelhante a papel de seda. Pôde ser cortada no tamanho escolhido para este experimento, de modo que houvesse sobra no momento de sua sutura às margens da lesão. Mostrou ser bastante resistente à tensão dos pontos e não rasgou quando perfurada pela agulha trifacetada que acompanhava o fio mononylon 2-0 escolhido para o experimento. Em seguida ao contato com os líquidos corpóreos (exsudato e sangue), a membrana começava a absorvê-los, embebendo-se tomando a aparência de um plástico transparente aderido à lesão (Figura 12).

Figura 12 - Aspecto da membrana aderida à lesão após a cirurgia.

A partir do primeiro dia, após a cirurgia, as membranas apresentaram um aspecto ressecado (Figura 13) e o manuseio para contenção dos animais provocava o descolamento da mesma. Nesse período, as feridas não apresentaram exsudato, estavam róseas e limpas.

Figura 13 - Aspecto da membrana aderida à lesão no primeiro dia após a cirurgia.

No segundo dia, as feridas, ainda recentes, estavam limpas e secas (sem presença de exsudato). Nesse período, algumas das membranas de CB-COL não foram mais encontradas fixas na lesão.

No terceiro dia, foi notada pouca diferença visualmente entre o tamanho das lesões (comparando-as entre si e com o tamanho das lesões no dia da cirurgia). Somente o grupo I apresentou aumento no tamanho das lesões em três dos quatro ratos tratados. Nos grupos II, III e IV, todos os ratos apresentaram uma diminuição no tamanho das feridas. As imagens das lesões com as suas respectivas coberturas são apresentadas na Figura 14.

Figura 14 - Terceiro dia: Grupos I (a - membrana de CB-COL - acima) e II (b - controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (c - hidrogel de CB-COL - acima) e IV (d - pomada de collagenase - abaixo) à direita.

No quarto dia, as diferenças e semelhanças já mencionadas para as feridas dos quatro grupos se mantiveram. As lesões permaneciam limpas, desenvolvendo tecido de granulação (principalmente nas margens), sem exsudato e sem inflamação ou contaminação aparentes (presença de pus, edema e eritema acentuado). As membranas que ainda estavam nas lesões, permaneciam fixas por alguns pontos e ainda tinham aspecto ressecado e escurecido (semelhante a uma casca).

No sétimo dia, o tecido de granulação já cobria toda a área das lesões e parecia mais abundante nas que receberam o hidrogel de CB-COL e a pomada de collagenase. As feridas com as membranas mantiveram-se secas, limpas, com presença de granulação mais discreta que nos outros três grupos. As membranas estavam escuras e secas, porém aderidas com alguns dos pontos (Figura 15). Sua adesão ao tecido subjacente demonstrou ser um tanto frágil, uma vez que era possível descolá-las se necessário (algumas se soltaram com a contenção e manipulação dos animais), ou seja, não estavam incorporadas ao tecido como desejado. Todas as lesões diminuíram de tamanho.

Figura 15 - Sétimo dia: Grupos I (a - membrana de CB-COL - acima) e II (b - controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (c - hidrogel de CB-COL - acima) e IV (d - pomada de collagenase - abaixo) à direita.

A partir do décimo quinto dia de avaliação, ficou evidente que o processo cicatricial estava sendo finalizado, pois a redução progressiva da área das lesões às tornou muito menores, mostrando a migração das margens das feridas no sentido centrípeto (reepitelização). Infelizmente, poucos ratos ficaram com a membrana até o 15º dia (Figura 16). As membranas dos outros animais caíram ou eles acabaram as arrancando antes desse período. Mesmo sendo umidificadas, elas tinham o aspecto seco e não foram encontradas nas gaiolas, podendo os ratos tê-las ingerido. A maioria das cascas (crostas) havia se soltado, deixando exposto o leito da ferida.

Figura 16 - Décimo quinto dia: Grupos I (a - membrana de CB-COL - acima) e II (b - controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (c - hidrogel de CB-COL - acima) e IV (d - pomada de collagenase - abaixo) à direita.

No trigésimo dia todas as lesões estavam cicatrizadas (Figura 17).

Figura 17 - Trigesimo dia: Grupos I (a - membrana de CB-COL - acima) e II (b - controle com coágulo - abaixo) à esquerda. Grupos III (c - hidrogel de CB-COL - acima) e IV (d - pomada de collagenase - gabaixo) à direita.

Uma importante característica da membrana de CB-COL que deve ser evidenciada é o seu efeito hemostático na lesão, observado durante o ato cirúrgico, no qual foi mais eficaz que o hidrogel.

Devido os resultados serem paramétricos, o teste ANOVA foi realizado. O tratamento I promoveu uma menor reparação da ferida no período de 3 dias ($p < 0,05$) comparado com os outros tratamentos. No período de 7 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

O pós-teste utilizado para a comparação das médias para os período foi o Teste t (LSD). Para o período de 15 dias, observou-se que entre os grupos III e IV não houve diferença estatística ($p > 0,05$), porém o grupo III apresentou uma média maior de reparação das feridas ($p = 0,0025$). Entre os grupos I e II também não se observou uma diferença estatística ($p > 0,05$), porém o grupo I apresentou uma média maior de reparação das feridas ($p = 0,0025$). Observou-se também nesse período a diferença estatística dos grupos I e II em relação aos grupos III e IV. O grupo II em

relação ao III teve uma diferença de média bem significativa ($p=0,001$), favorecendo os resultados do uso do hidrogel de CB-COL para a reparação das feridas.

No período de 30 dias, todos os grupos apresentaram 100% das lesões fechadas.

Os valores das médias da redução do tamanho das lesões entre os grupos, $\pm$ erro padrão, em relação aos períodos experimentais são apresentadas no gráfico abaixo (Figura 18). A apresentação desses valores, na forma de porcentagem, foi baseada no trabalho de Sanchez (2012).

Figura 18 - Reparação tecidual das lesões dos grupos I, II, III e IV em relação aos períodos experimentais de 3, 7, 15 e 30 dias. Os valores estão expressos em médias $\pm$ erro padrão.

4.3 Análise Histológica

4.3.1 Reação Inflamatória

Os resultados da avaliação histológica das 512 lâminas (128/grupo) mostram (Figuras 19-22) a reação inflamatória tecidual para os quatro grupos e nos quatro períodos avaliados. Houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos em todos os períodos estudados ($p<0,05$).

Aos três dias de pós-operatório as feridas tratadas com a membrana e o hidrogel de CB-COL apresentaram uma moderada reação inflamatória em relação

às feridas controle e às feridas tratadas com a pomada de colagenase que apresentaram uma leve reação inflamatória ($p < 0,05$). Aos sete dias, foi observada moderada reação inflamatória em todos os espécimes estudados, porém estatisticamente a reação inflamatória no grupo da membrana foi maior em relação ao grupo controle e similar aos outros tratamentos ($p = 0,0061$). Em 15 dias de pós-operatório, foi observada uma leve reação inflamatória para os grupos controle, hidrogel e colagenase, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Já as feridas tratadas com a membrana apresentaram uma moderada reação inflamatória sendo estatisticamente significativa comparada aos outros grupos no mesmo período ($p < 0,05$). Aos 30 dias de pós-operatório as feridas tratadas com o hidrogel apresentaram uma média maior de reação inflamatória em relação ao grupo controle, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$), porém sendo similar aos outros tratamentos com a membrana e com a colagenase ($p > 0,05$).

4.3.2 Reconstituição do Epitélio

Os resultados da avaliação histológica (Figuras 19-22) mostram a reconstituição epitelial para os quatro grupos e nos quatro períodos avaliados. Somente foi observado diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos aos 7 dias de pós-operatório ($p = 0,0364$), sendo que o hidrogel apresentou uma tendência para uma reparação mais rápida ($p < 0,05$).

4.3.3 Qualidade, Quantidade e Orientação das Fibras Colágenas

Os resultados da avaliação histológica (Figuras 19-22) mostram a qualidade, a quantidade e a orientação das fibras colágenas para os quatro grupos e nos quatro períodos avaliados.

Em 3 dias de pós-operatório não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos propostos ($p > 0,05$). Ao sétimo dia, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p = 0,0001$), sendo que as feridas tratadas com o hidrogel e com a colagenase apresentaram uma melhor organização das fibras colágenas em relação às feridas do grupo controle e as tratadas com a membrana ($p < 0,05$). Aos quinze dias de pós-operatório também foi observada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p = 0,0001$), sendo que

as fibras colágenas apresentaram-se com uma organização bastante avançada, característica de tecido cicatricial, nos grupos das feridas tratadas com o hidrogel e a collagenase, não havendo diferença estatisticamente significativa entre estes 2 grupos ($p>0,05$). A membrana de CB-COL favoreceu uma melhor organização das fibras colágenas em relação ao controle ($p=0,005$), porém com menos fibras colágenas em relação aos grupos do hidrogel e da collagenase ($p=0,0072$). Aos 30 dias de pós-operatório, os 3 tratamentos propostos, membrana e hidrogel de CB-COL e collagenase apresentaram um padrão de reparação tecidual similar, com bastante fibras colágenas espessas e orientadas, diferentemente do grupo controle que apresentou fibras colágenas com um menor grau de organização em relação à reparação tecidual destes outros tratamentos ($p=0,0001$).

Figura 19 - Período de 3 dias; (a) – observa-se no grupo I, a ausência de epitélio, início de neovascularização, crosta, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (b) – observa-se no grupo II, a ausência de epitélio, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (c) – observa-se no grupo III, epitélio em processo de cicatrização, início de neovascularização, crosta e tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória média com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (d) – observa-se no grupo IV, a ausência de epitélio, crosta e tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória média com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E).

Figura 20 - Período de 7 dias; (a) – observa-se no grupo I, a ausência de epitélio, neovascularização, crosta e tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (b) – observa-se no grupo II, a ausência de epitélio, início da neovascularização, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória severa com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (c) – observa-se no grupo III, epitélio em processo de cicatrização, início de neovascularização, crosta, tecido de granulação com início de organização e com reação inflamatória moderada com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos; (d) – observa-se no grupo IV, a ausência de epitélio, início da neovascularização, crosta e tecido de granulação com início de organização e com reação inflamatória moderada com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares como macrófagos e neutrófilos. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E).

Figura 21 - Período de 15 dias; (a) – observa-se no grupo I, reepitelização, neovascularização, presença de glândulas e tecido de granulação com início de organização e com reação inflamatória moderada com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares; (b) – observa-se no grupo II, reepitelização, camada de queratina, início da neovascularização, tecido de granulação desorganizado e com reação inflamatória média com infiltrado composto predominantemente de leucócitos polimorfonucleares; (c) – observa-se no grupo III, reepitelização, neovascularização, tecido de granulação maduro e com reação inflamatória leve; (d) – observa-se no grupo IV, reepitelização completa, camada de queratina, neovascularização completa, tecido de granulação maduro e com reação inflamatória leve. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E); camada de queratina (F); presença de glândulas (G).

Figura 22 - Período de 30 dias; (a) – observa-se no grupo I, tecido organizado, onde se observa reepitelização, camada de queratina, neovascularização, presença de glândulas e folículo piloso; (b) – observa-se no grupo II, tecido organizado, reepitelizado, neovascularizado, camada de queratina e presença de glândulas; (c) – observa-se no grupo III, reepitelização completa, camada de queratina, neovascularização completa, folículo piloso; (d) – observa-se no grupo IV, o tecido organizado, com glândulas e folículo piloso. HE. Epitélio (A); neovascularização (B); crosta (C); tecido de granulação (D); leucócitos polimorfonucleares (E); camada de queratina (F); presença de glândulas (G); presença de folículo piloso (H).

5 DISCUSSÃO

O MEV é uma ferramenta padrão para inspeção e análise em diversas áreas de pesquisa desde a área de materiais até a área biológica. O poder de resolução da maioria dos mais modernos microscópios eletrônicos é cerca de 100 vezes melhor do que a resolução do microscópio óptico (BENDO; CHRISTOFOLETTI, 2007).

As imagens das micrografias do hidrogel de CB-COL revelaram características similares ao colágeno puro, com uma estrutura porosa, demonstrando que a presença da celulose bacteriana não altera as propriedades microscópicas do hidrogel. A técnica de MEV é largamente utilizada para o estudo da porosidade de materiais produzidos por eletrofiação, visto que técnicas como porosimetria de mercúrio podem ser destrutivas devido à alta pressão aplicada (RAMAKRISHNA et al., 2005). Entretanto, uma análise de poros via MEV é limitada, pois fornece informações apenas dos poros que se encontram na superfície do material. Muitos poros gerados através do intumescimento de hidrogéis produzidos a partir de filmes ou soluções podem não estar interconectados (BONACIN, 2011).

A termogravimetria é amplamente usada em quase todas as áreas da química e campos aliados. A técnica TG é originalmente aplicável quando se deseja acompanhar variações de massas envolvidas num experimento, sendo seus resultados fundamentalmente de ordem quantitativa (CARVALHO; KAMATSU, 2007).

Um evento importante de perda de massa foi observado para todas as amostras numa faixa que variou de 250 °C a 400 °C. Este evento está relacionado à decomposição da CB, cuja decomposição inclui processos de degradação e decomposição das unidades glicosídicas deste polímero seguido da formação de resíduos carbonáceos, que correspondem em torno de 23% do resíduo final, encontrados nas amostras de CB. Antes deste importante evento de perda de massa, pôde-se observar um pequeno evento de perda de massa em torno de 200°C nestas amostras; estes eventos podem estar associados tanto com o processo de degradação da celulose, quanto à degradação das moléculas de colágeno (BARUD et al., 2007; BARUD et al., 2008). Segundo Szczesniak et al. (2008), geralmente a estabilidade térmica é aumentada com a adição de uma fase mineral à fase orgânica, e esse comportamento pode ser analisado em função da

temperatura de decomposição, a qual caracteriza a estabilidade térmica dos materiais; comportamento este que pôde ser comprovado neste estudo. Desta forma, a amostra do hidrogel de CB-COL apresentou estabilidade térmica adequada. Este aumento na estabilidade da cobertura (CB-COL) pode estar relacionado à formação de novas ligações de hidrogênio com a precipitação da fase mineral, e também há uma barreira dificultando a entrada dos gases. Segundo Zhang et al. (2008), esse comportamento tem sido atribuído a grande área superficial dos minerais, o que favorece fortes interações com os polímeros, além de reduzirem o movimento de suas cadeias nos nanocompósitos. Os minerais ainda podem exercer uma importante propriedade de barreira, retardando a difusão de calor e gases como o oxigênio e nitrogênio, no caso dos polímeros.

A amostra do hidrogel de CB-COL apresentou um padrão de curva TG similar ao colágeno puro e a CB, sendo que independente da metodologia empregada para incorporar o colágeno à cobertura, a mesma não influenciou na estabilidade térmica dos compósitos contendo colágeno.

A radiação de infravermelho (IV) corresponde à parte do espectro eletromagnético situada entre as regiões do visível e das microondas. O fato de cada grupo funcional absorver uma dada frequência característica permite que por meio de um gráfico de intensidade de radiação versus frequência, o espectro de IV, seja possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido (CIENFUEGOS; VAITSMAN, 2000). A técnica de FT-IR não é destrutiva, e permite espectros de amostras pouco solúveis, em filmes no estado sólido, como o caso das membranas processadas (GRANDE, 2009).

Os espectros apresentaram bandas características de uma proteína: em torno de $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ que indicou o estiramento de uma carbonila; em 1560 cm^{-1} , são associadas às vibrações da amida II no plano da ligação N-H; em 1450 cm^{-1} indicou a presença dos anéis pirrolidínicos da prolina e hidroxiprolina. Embora existam algumas variações em relação à intensidade dos modos vibracionais detectados, os valores obtidos estão de acordo com os mencionados na literatura (TONHI; PLEPIS, 2002). Além disso, a razão de intensidade relativa das bandas 1240 e 1450 cm^{-1} , em ambas amostras é, segundo Sylvester (1989), indicativa da preservação da estrutura secundária em tripla hélice da molécula de tropocolágeno.

Difração de raios-X (DRX) é uma técnica largamente utilizada na caracterização de estrutura de materiais. Os raios-X são ondas eletromagnéticas de

comprimento de onda de ordem do 1 Å. O seu comprimento de onda é, portanto, da ordem de grandeza do espaçamento dos átomos numa rede cristalina. Este é um aspecto muito importante, pois torna possível a observação do fenômeno da difração e a obtenção de informação sobre o objeto que difrata a radiação. No caso de um cristal, a difração é feita pelos átomos da rede cristalina. A radiação difratada é, no entanto mais intensa segundo determinadas direções. Esta é uma técnica utilizada para a identificação da composição elementar de uma amostra, ou uma área de interesse da mesma (BENDO; CHRISTOFOLETTI, 2007).

Em relação às caracterizações, o padrão de DRX para o colágeno resultou em um halo em torno de $2\theta = 10^\circ - 25^\circ$, o qual é típico padrão de DRX de colágeno puro; mostrando ser um polímero bastante amorfo (ZHANG et al., 2004). Notou-se que o padrão da CB-COL não se trata de uma simples mistura de CB e COL, pois no padrão do DRX do compósito CB-COL observou-se o aparecimento de um novo pico ao redor 17° , sugerindo que a incorporação do colágeno afetou a cristalinidade da CB principalmente na região $2\theta = 15^\circ$; além disso, houve uma diminuição na intensidade dos picos da CB. Esta diminuição também pode estar relacionada à presença do colágeno inserido à estrutura de CB (SASKA, 2011). É interessante ressaltar ainda que a CB exibe elevada cristalinidade, e esta propriedade está diretamente ligada a sua excelente resistência mecânica.

O colágeno puro apresentou as bandas típicas para proteínas em torno de 1600 cm^{-1} , referentes a estiramento C=O amida I e deformação N-H para amida II, respectivamente. Nos espectros de CB e CB-COL observaram-se uma banda típica em 1645 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O de amida I. As bandas observadas ao redor de 1420 e $1320-1210\text{ cm}^{-1}$ correspondente à deformação C-O de ácidos carboxílicos ou a estiramento simétrico de COO^- de aminoácidos livres estão presentes nos três sistemas contendo CB. Observou-se que a intensidade desta banda diminuiu com a presença de glicina e de colágeno, sugerindo a formação do sistema CB-Gly e da amostra de CB-COL.

A cicatrização depende de dois pilares fundamentais: a vascularização e a capacidade de produzir colágeno. A vascularização, além de promover a chegada das células ao sítio inflamatório, promove o aporte de nutrientes e oxigênio. Para Reed et al. (1998), a formação de vasos é modulada pelo fator de crescimento transformador básico (TGF- β) e pelas proteínas da matriz. O TGF- β aumenta a

produção de citocinas, as quais induzem a angiogênese, estimulam a produção de colágeno tipo I e inibem a produção de collagenase intersticial.

De acordo com Gabbiani; Majno (1972), o processo de cicatrização das feridas abertas é diferente das fechadas, apesar das reações após as lesões serem idênticas para as duas, ocorrendo exsudação inflamatória, neoformação vascular, proliferação celular, migração celular e epitelização a partir das margens.

No presente estudo, após o terceiro dia da cirurgia, o tamanho da ferida pareceu diminuir numa frequência constante, que progressivamente declinou ao 10º ou 12º dia. Após este período, o tamanho da ferida se aproximou de zero, tornando difícil uma medida perfeita, visto que este é o estágio final de sua cicatrização.

Os resultados de Sanchez Neto (1993) demonstraram que houve diminuição progressiva nos tamanhos das feridas de quase todos os animais em todos os dias de avaliação. A explicação para este fato pode ser o que se refere às feridas abertas submetidas a um processo de contração na tentativa de reparação da lesão.

Em alguns animais, foi observado o aumento da lesão, principalmente no período de 3 dias avaliado. A medida da ferida aumentou provavelmente porque as margens da lesão sofreram retração centrífuga devido à tensão elástica da pele circunjacente, perda de aderência à fáscia profunda e mobilidade da pele do rato (CROSS et al., 1995; TEO; NAYLOR, 1995).

Quando numa ferida plana inicia-se o processo de cicatrização, sua área torna-se progressivamente menor, devido ao movimento centrípeto de suas margens, sobretudo em resposta à ação de miofibroblastos presentes no tecido de granulação (MACGRATH, 1983; ZACHARIAS, 1991). Este fenômeno ocorre com a contração da ferida e sua conclusão pode requerer meses, sendo muitas vezes incompleta (FALCÃO, 2001). Em curto prazo, o fechamento de uma ferida por processo de contração de suas margens é considerado insuficiente restando ainda uma área situada dentro do perímetro correspondente, denominada de área de epitelização e, no espaço de tempo referido, a cicatrização completa-se como resultado de uma combinação dos processos de contração e epitelização (MACGRATH, 1983).

Cada fase da cicatrização apresenta uma célula ou substância característica sem a qual o processo não evolui normalmente. Uma grande variedade de fatores pode influenciar em qualquer fase da cicatrização. Os principais fatores locais incluem sangramento, tensão de oxigênio, bactérias, entre os fatores extrínsecos

que são conhecidos: técnica cirúrgica, antissépticos tópicos e coberturas (WALDORF; FEWKES, 1995).

A fase inicial da cicatrização é chamada de inflamatória e é vital para o processo de reparação. O papel da fase inflamatória, incluindo a migração de neutrófilos para os tecidos, tem sido debatido na literatura, e a maioria dos pesquisadores é de opinião que neutrófilos têm um importante papel eliminando debris (fragmentos celulares), protegendo da infecção e liberando substâncias promotoras da cicatrização. O deslocamento de neutrófilos se inicia imediatamente após a lesão tecidual, atingindo um pico de concentração em apenas 12 horas (CLARK, 1996). Estes achados estão de acordo com os de Masini e Calamo (1986) de que os leucócitos são as primeiras células inflamatórias a aparecerem na área da lesão e têm vida curta. Com relação à atividade proteolítica, Espey (1980) demonstra o envolvimento das proteases (quimiotripsina e catepsina) e da collagenase, que atuam não apenas facilitando a destruição de corpos estranhos, mas também hidrolisando o colágeno, cujos peptídeos resultantes agiriam como substância quimiotática, estimulando a proliferação de fibroblastos.

No atual estudo, não houve sinal de resposta inflamatória aguda nos animais operados que receberam as coberturas testadas, comparadas aos dos grupos controles. O fato da presença da cobertura de celulose não promover uma exacerbação e prolongamento do processo inflamatório deve-se às suas características físicas e de biocompatibilidade, como sua porosidade, textura da superfície, consistência e propriedade químicas, que promovem uma melhor reação tecidual não perpetuando o processo inflamatório (HART et al., 2002; COHN et al., 2004). Um dos aspectos importantes é a capacidade da cobertura em conter exsudato em seu interior, formando dessa maneira um hidrogel aderente que é efetivo para encapsular e imobilizar populações bacterianas potencialmente patogênicas, que promoveriam um processo infeccioso e consequente exacerbação e prolongamento da inflamação.

A questão da compatibilidade foi investigada através da observação da resposta inflamatória local. A presença de processo inflamatório representa a participação das células no processo de reparação dos tecidos (AMORIM et al., 2009).

A epiteliação é uma fase precoce do processo de cicatrização. Já nas primeiras 24 horas, após a lesão, começa a proliferação das células epiteliais nas

margens da ferida, levando a um espessamento do epitélio marginal. Ao mesmo tempo, as células proliferadas migram sobre a derme, dirigidas pela rede de fibrina. Os anexos da pele perdem sua estrutura normal e contribuem para o progresso da epitelização, que se dá a partir das células epiteliais dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e de seus ductos. Vários fatores de crescimento epidérmico liberados dos macrófagos, como o TGF- β (fator β transformador do crescimento), EGF (fator de crescimento epidérmico), PDGF (fator de crescimento das plaquetas) e IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina 1), aceleram a epitelização (BEVILACQUA, 1981; SIMÕES, 1988; ARAÚJO, 1997). Quando encontram corpos estranhos de grandes dimensões, os macrófagos fundem-se com os outros, constituindo células grandes, contendo vários núcleos, as chamadas células gigantes ou multinucleadas (COTRAN et al., 2000).

Nas feridas dos grupos testados, foram observadas células gigantes na derme. Esse ocorrido é em consequência de macrófagos/interações de biomateriais, que não há fusão de macrófagos aderentes levando à formação de células gigantes multinucleadas de corpo estranho em superfícies de biomateriais (MURCH et al., 1982; ANDERSON, 1988). Este fenômeno das células gigantes de corpo estranho acontece mediante a degradação do biomaterial (ZHAO et al., 1991; WIGGINS et al., 2001), no qual é o resultado da ação da reação do oxigênio dentro de um compartimento acidificado fechado entre as células gigantes de corpo estranho e o substrato do biomaterial (HEIPLE et al., 1990).

A integridade do epitélio é um importante parâmetro definidor de cicatrização e cura por segunda intenção e a regeneração tecidual desse tecido é um processo de intensa restauração e reorganização dos vários tecidos envolvidos nesse processo (DUYNSTEE et al., 2002). A ausência de uma diferença estatisticamente significativa desse parâmetro é um dado importante que mostra o não prolongamento e cronificação da resposta inflamatória nos casos com o uso da cobertura de celulose, quando comparada com o controle, que caso ocorresse, poderia evoluir para o rompimento do tecido, podendo levar à extrusão do enxerto e às alterações cicatriciais (DORMER et al., 1995). Tal fato demonstra que a cobertura de celulose não promoveu uma reposta tecidual exacerbada que poderia ser um fator desfavorável para o seu uso. No presente trabalho houve diferença estatística na reconstituição do epitélio somente para o grupo III (hidrogel CB-COL) no período de 7 dias, pois esse tratamento demonstrou uma reepitelização mais rápida.

É importante levarmos em consideração a presença de um epitélio íntegro em todos os casos dos grupos tratados. Isso nos leva a inferir que a cobertura de celulose não prolonga a inflamação, mas não nos permite comprovar se ele acelera o processo de cura, como foi demonstrado em estudos com celulose de Cohn et al. (2004); Costa et al. (2005); Hart et al. (2002).

O conhecimento dos eventos fisiológicos por meio dos quais se processa a cicatrização das feridas tem grande importância, sendo a sua contração uma etapa importante do fechamento das lesões que cicatrizam por segunda intenção. Ela é tida por alguns investigadores como sendo controlada pelos miofibroblastos porque eles são vistos em grande número perto das margens das feridas contraídas, associados ao movimento centrípeto do tecido preexistente (SIMÕES, 1988). O real mecanismo pelo qual se inicia a contração da ferida ainda é questionado, pode ocorrer nas margens da ferida, (BEVILACQUA, 1981; ARAÚJO, 1997) ou na sua parte mais profunda, ou em ambos os locais (BEVILACQUA, 1981). Em curto prazo, o fechamento de uma ferida pela contração de suas margens é considerado insuficiente, pois resta quase sempre uma área central cujo fechamento é por epitelização, de modo que a cicatrização se completa como resultado de uma combinação dos processos de contração e epitelização (MACGRATH; SIMON, 1983).

Modolin et al. (1985) relataram que uma das características da última fase do processo de reparação tecidual (fase de maturação) é a regressão endotelial. Nesta fase ocorre a epitelização da lesão, que é controlada por complexo glicoprotéico denominado chalona, e que estimula a atividade mitótica epitelial (ÁLVARES, 1972).

Uma propriedade fundamental da pele é a sua capacidade de responder ao tratamento. Em populações de ratos, estas respostas são claramente adaptativas, em que a primeira resposta, eritema, é um sinal de que o sistema imunitário está ativo e o processo de cura foi iniciado. Muitos animais podem ser utilizados como modelo para estudo da cicatrização, porém os mamíferos são os melhores para estes estudos por assemelharem-se ao homem na deposição de colágeno nas feridas. Os roedores, principalmente os ratos, são os mais usados por terem baixo custo, serem de fácil transporte e obtenção, e ocuparem pouco espaço (COHEN; MAST, 1990).

A pele de rato apresenta diferença importante em relação à humana que é a ausência de um limite definido entre derme papilar e derme reticular. Apesar dos

achados histológicos diferentes da pele humana (a derme do rato é mais espessa e não apresenta tecido gorduroso subcutâneo nem tela muscular subcutânea), os vasos sanguíneos, responsáveis pela irrigação cutânea, são subdérmicos em ambos e apresentam as mesmas alterações de perfusão de macro e microvascularização (MCFARLANE et al., 1965).

As lesões foram realizadas no dorso do rato, por ser uma região relativamente protegida de contaminação, pelo menor contato com fezes e com a saliva do animal, o que diminui o risco de infecções. Foi produzida uma lesão cutânea total, ou seja, removendo toda a espessura da pele, até o plano fascial, com o objetivo de se retirar toda e qualquer camada proliferativa central que pudesse propiciar uma cicatrização espontânea rápida, de modo que a ferida teria o estímulo máximo das respostas fisiológicas, inclusive com a contração da cicatriz e epitelização central. Seria esse o modo, portanto, de mimetizar uma lesão cutânea grave, cuja cicatrização espontânea é sempre lenta. Há semelhança da técnica operatória utilizada por Miranda (2001) com o atual estudo, pois a ferida também foi colocada no dorso do animal para que não houvesse interferência dele no mecanismo de cicatrização, evitando a irritação por contato e autocanibalismo (SILVA et al., 1995; KASHYAP et al., 1995).

Os animais foram mantidos em gaiolas separadas, pois se os deixassem em gaiolas coletivas poderiam causar novos danos teciduais devido ao contato entre eles, comprometendo, portanto, a análise do processo cicatricial. Kashyap et al. (1995) realizaram um trabalho com iodo povidine em camundongos e citaram como problema em potencial a interferência da lambida do animal na cicatrização da ferida, visto que a saliva de camundongo contém vários fatores de crescimento.

A exposição repetida do animal a procedimentos anestésicos pode ser deletéria à sua saúde, consome tempo e pode causar danos à ferida durante a indução da anestesia. No trabalho com ratos de Oliveira et al. (2001), nenhuma anestesia adicional foi usada para a contenção e mensuração da área da ferida, contrastando com outros estudos, onde a exposição repetida do animal à anestesia poderia aumentar seu estresse, e o risco de injúria ao delicado tecido de granulação da ferida, especialmente durante a fase de indução. Estes fatores são difíceis de controlar e são importantes por contribuírem para um atraso na contração da ferida. No presente trabalho foram tomados tais cuidados e, certamente, o temperamento

dócil dos animais facilitou a manipulação diária sem anestesia, evitando-se lesão adicional às feridas.

A ferida operatória foi estudada por observação macroscópica nos dias considerados mais significantes para o estudo do processo de reparação tecidual da pele dos ratos. A avaliação macroscópica das lesões visou observar principalmente, hemorragias, presença de crostas e presença de secreções. Durante o estudo, não ocorreu nenhum episódio de hemorragia, apenas sangramentos inerentes aos procedimentos cirúrgicos, controlados somente por compressão de gazes e pela membrana de CB-COL, que apresentou hemostasia quando colocada sobre a lesão.

A ausência de reação granulomatosa (reação inflamatória crônica) demonstra uma resposta favorável do tecido hospedeiro ao implante da cobertura. A reação de biocompatibilidade trata-se de uma resposta de reação de corpo estranho e de reação cicatricial que pode progredir para uma resposta favorável com a formação de uma fina cápsula fibrosa envolvendo o implante e/ou o crescimento de tecido dentro do biomaterial. Pode também evoluir para uma reação contínua, inflamatória crônica, caracterizada por formação de cápsula fibrosa espessa, granulação e rompimento do tecido com subsequente formação de abscesso ou fístula, culminando com extrusão do enxerto e alterações neoplásicas (DORMER et al., 1995).

O estudo de Nemetz et al. (2001), sobre a possível formação de uma cápsula fibrosa em um grupo de estudo durante uma semana, demonstra que a celulose pode até induzir a uma proliferação fibrosa inicial, porém com o passar dos dias o processo cicatricial evolui normalmente e espontaneamente.

Os grupos apresentaram uma crosta rígida, escura e espessa. Isto provavelmente deve-se às proteínas e exsudatos de feridas interligados com os constituintes do extrato favorecendo a homeostase local, e protegendo o novo tecido, formando uma cobertura externa (MEZADRI et al., 2009). No entanto, um resultado positivo em visualização macroscópica foi à queda do coágulo. A queda antecipada dos coágulos das feridas tratadas no grupo I pode sugerir que os processos celulares e químicos que influenciaram a presença do coágulo foram facilitados pela membrana de CB-COL (MENSAH et al., 2001).

Nas feridas dos respectivos grupos, não foi constatada a formação de exsudato purulento corroborando com os achados por Costa (1986), sugerindo uma propriedade protetora das coberturas. A formação de exsudato purulento é um sinal

de reação inflamatória exacerbada, causada pela falha do material em oferecer biocompatibilidade, promovendo assim uma resposta inflamatória insatisfatória (SEVASTJANOVA et al., 1987). O fato de não ocorrer formação do exsudato purulento demonstra a boa resposta do organismo às coberturas que consequentemente possibilitou um processo cicatricial mais adequado (BENZIMAN et al., 1980). Dentre estas, salientamos também o fato de apresentar poros pequenos o bastante para impedir a entrada de bactérias, mas grandes o suficiente para que o tecido tenha uma adequada aeração (MATEOS, 2004). As propriedades do colágeno provavelmente permitiram a precipitação de células e de tecidos lesados formando um revestimento protetor contra as bactérias.

As crostas estavam presentes em maior extensão nas feridas do 7º dia de avaliação, em todos os grupos. O mesmo foi observado por Bevilacqua (1984) e Simões et al. (1986), segundo os quais a solução de continuidade causada pela remoção do fragmento de pele é inicialmente preenchida por coágulo, fibrina e exsudato inflamatório, que originam a crosta fibrinoleucocitária.

As crostas fibrinoleucocitárias das feridas dos animais foram facilmente removidas no sétimo dia de pós-operatório, de modo a permitir que o medicamento atuasse diretamente sobre as feridas, além de facilitar a avaliação dos aspectos morfológicos e morfométricos. Tal procedimento facilitou a avaliação macroscópica das feridas, assim como aumentou a área de tecido viável em contato com a lesão, concordando com Eurides et al. (1998). No presente trabalho, algumas crostas haviam se soltado espontaneamente a partir do sexto dia de pós-operatório, não ocorrendo sangramento após a retirada das crostas remanescentes no sétimo dia.

Winter (1962) descreve a importância da manutenção da umidade do leito da ferida, auxiliando enzimas como as collagenases e proteinases na capacitação de migração de células através da ferida para onde há fibrina. Quando uma ferida seca, ocorre a formação de uma crosta, fazendo com que as células epiteliais penetrem mais profundamente na ferida para encontrar a umidade necessária para a sua proliferação.

Vogt et al. (1995) observaram que a cicatrização em meios líquido e úmido foi significativamente mais rápida comparada com feridas secas. No presente trabalho, o fato do hidrogel de CB-COL e a pomada a base de collagenase serem aplicados diariamente e permanecerem por mais tempo nas feridas, mantiveram o meio úmido, em contraste com a membrana e o controle com coágulo.

A epitelização pode ser acelerada se a ferida for mantida úmida (WINTER, 1962). Uma explicação para isso é que os queratinócitos migram mais facilmente sobre a superfície da ferida úmida do que sobre uma crosta (WINTER; SCALES, 1963). Células epidérmicas podem migrar a uma velocidade de 0,5 mm/dia ao longo de uma superfície de ferida úmida, que é duas vezes mais rápida do que sob uma crosta em feridas secas (WINTER, 1972).

O método mais utilizado em estudos experimentais é a análise histológica com coloração de hematoxilina-eosina (HE) (HÖGSET; BREDBERG, 1986; WEBER et al., 2006). Neste trabalho optamos pela análise histológica por ser um método simples e por fornecer informações da resposta tecidual ao material implantado. A coloração por HE foi escolhida por se tratar de corante universal, usado rotineiramente para avaliações em estudos histológicos, além de ser simples, barato e adequado para quantificar e identificar os elementos celulares envolvidos no processo cicatricial (NUNES Jr. et al., 2006). O corante utilizado na HE revelou-se adequado, não havendo necessidade do uso de colorações adicionais.

Em resumo, os eventos histológicos do processo cicatricial do atual estudo apresentaram três fases distintas, porém superpostas: fase exsudativa – resposta inflamatória aguda (0 – 4 dias); fase proliferativa – predomínio da fibroplasia (3 – 14 dias); e fase de reorganização e remodelagem – maturidade do colágeno (10 – 180 dias ou mais) (HERRMANN et al., 1964).

Em animais como o rato, a contração da cicatriz gerada por forças celulares e elementos contráteis de fibroblastos e miofibroblastos, os quais aparecem na ferida já no final da primeira e começo da segunda semana, é o principal mecanismo de oclusão da ferida (SIMÕES, 1988).

Segue-se então a fase proliferativa ou de fibroplasia (após as 48 horas da lesão). A síntese de colágeno pela ação dos fibroblastos é mais intensa em torno do quinto ao sétimo dia de pós-operatório. A força de tensão da ferida aumenta com a formação de fibras colágenas e a adesão destas fibras entre si atinge o máximo entre o 14º e o 15º dias de pós-operatório (CLARK, 1996). A proliferação endotelial, processo fundamental no mecanismo de cicatrização, depende da presença de macrófagos, que promovem a neo-angiogênese devido às suas interações com prostaglandinas e tromboxanes. Em contiguidade aos capilares rompidos, originam-se brotos endoteliais que proliferam rapidamente, formando cordões sólidos, entremeando-se com os fibroblastos, que se canalizam permitindo o fluxo

sanguíneo. O conjuntivo recém-formado, intensamente vascularizado, constitui o tecido de granulação (ÁLVARES, 1972; MODOLIN et al., 1985, SANCHEZ NETO et al., 1993).

O fibroblasto é célula reguladora por apresentar a dupla função de síntese e reabsorção de colágeno, procurando manter o equilíbrio quantitativo e qualitativo desta proteína (SIMÕES et al., 1986). A substância hialinizada é produzida pelo fibroblasto no tecido de granulação e é composta por mucopolissacarídeos, que estão envolvidos com a produção e orientação das fibras colágenas (AUERSVALD, 2001). Em seguida, inicia-se a fase proliferativa ou de fibroplasia. Em torno de quatro dias, estas células predominam no tecido de granulação em desenvolvimento. A densidade dos fibroblastos alcança o máximo entre 7 e 14 dias, após a injúria, sob a influência de potentes fatores de crescimento da ferida (MASINI; CALAMO, 1986). A presença de processo inflamatório crônico, com aumento de fibroblastos e reações gigantocelulares, promove melhora na cicatrização, o que se reflete no aumento da resistência das suturas no 7º dia (CARMELLO-GUERREIRO; PAOLI, 1999). Conforme descrito por Simões et al. (1986) e por Carmello-Guerreiro e Paoli (1999), o elemento essencial do fibroblasto, o colágeno, proporciona a força de estiramento das feridas em cicatrização e a sua quantidade e estabilidade refletem-se na resistência da ferida, e, portanto, na sua carga de ruptura. A proliferação fibroblástica e a deposição de colágeno são responsáveis pelo desenvolvimento de força tênsil, adequada para uma boa evolução da cicatriz. A partir do 3º dia do início do processo de cicatrização já se encontram fibroblastos e colágeno na área da sutura. Entre o 7º e o 14º dias, a síntese do colágeno atinge seu ápice (MESQUITA, 2002).

Foi mencionado por Razzak (2001) que a taxa de contração de feridas é largamente influenciada pela função de fibroblastos e formação de colágeno na área da ferida. Nas primeiras 24 horas, a contração da ferida foi maior em alguns ratos. Isso pode ser explicado pela retração natural da ferida que ocorre devido às forças elásticas e a tensão da pele que não sofrem influência do tratamento (MASOKO et al., 2010).

Nas amostras testadas, era esperada uma reação inflamatória aguda maior nos animais dos grupos tratados em comparação aos grupos controles. No entanto, isso não ocorreu em nenhum dos grupos estudados de maneira estatisticamente significativa, demonstrando que a celulose e o colágeno não foram capazes de

produzir esse tipo de reação de maneira tão intensa, a ponto de haver diferença estatística entre os grupos. A reação inflamatória tem importância na cicatrização como demonstram diversos trabalhos, sendo que é nociva se for intensa, pois compromete a microcirculação e a proliferação de fibroblastos (TOGNINI et al., 2000). O grau de intensidade da resposta inflamatória pode ser de fundamental importância neste processo. Miller (1973) ressalta que certo grau de inflamação é necessário, contudo uma reação inflamatória intensa é prejudicial, pois pode prejudicar o adequado suprimento sanguíneo pelo comprometimento da microcirculação e ainda irá dificultar a proliferação celular (fibroblastos). A fase Inflamatória é um pré-requisito necessário para a cura normal (KIRSNER; EAGLSTEIN, 1993). Segundo Balakrishnan et al. (2005), isto pode ser iniciado por várias causas, uma das quais é a lesão. Portanto, durante a fase inicial de cicatrização de feridas, é difícil avaliar se a resposta inflamatória é parte do processo normal de cicatrização ou devido ao efeito do material.

O uso de uma membrana biologicamente inerte, não associada à resposta inflamatória e infecciosa, pode ser de grande utilidade em estudos futuros, já que os achados desse trabalho foram compatíveis com outros estudos com coberturas de celulose em animais (PANERARI et al., 2008). Tais achados são compatíveis com os realizados com a cobertura de celulose em outras áreas corpóreas, os quais demonstraram que a membrana não é um fator que promove o prolongamento do processo cicatricial das lesões (COSTA; SOUZA, 2005). Portanto, a membrana de CB-COL, devido as suas vantagens de efeito hemostático, troca única da cobertura temporária e barreira contra infecção, faz dela um biomaterial potencial para aplicações em tratamentos de feridas.

Recentemente, tornaram-se aparentes muitos problemas encontrados após a aplicação de “películas” de queratinócitos, ou seja, contrações cicatriciais ou instabilidade na fixação da epiderme ao tecido subjacente, que poderiam ser atribuídos à ausência de um substrato dérmico (GIRARDI, 2005). Um problema de fixação também foi observado, sendo que somente poucos ratos no período de até quinze dias ainda estavam com as membranas de CB-COL. Provavelmente eles as arrancaram e as comeram, pois além de as membranas não serem mais encontradas nas gaiolas, no momento da umidificação foi observado que eles se contorciam para coçar a parte da lesão com as patas e com a boca.

Devido o colágeno possuir excelentes propriedades biocompatíveis e ser capaz de aderir às superfícies da mucosa, caracteriza-se a membrana e o hidrogel de CB-COL como muco-adesivos, sendo necessários novos estudos que comprovem essa propriedade de ligar-se fracamente às superfícies sem causar danos. O colágeno não só confere a resistência e a integridade da matriz tecidual, mas também desempenha um papel importante na homeostase e em epitelização na fase posterior de cura (GUPTA et al., 2009).

A facilidade de aderência que ocorre em celulose tem contribuído para o seu uso em materiais compósitos à base de fibra. A aderência de celulose, que tem recebida considerável atenção sobre a metade do século passado, ocorre ao longo de uma escala de comprimento prático, que vão desde a escala nanométrica até milímetros. O comportamento das superfícies de celulose em diferentes meios, bem como a sua interação com diferentes produtos químicos é de grande importância em sua atual e futuras aplicações (fabricação de papel, compósitos e nanocompósitos). O desempenho mecânico de materiais compósitos, por exemplo, é dependente do grau de dispersão das fibras da matriz do polímero, da natureza e da intensidade das interações da adesão fibra-polímero. O fenômeno de adesão é a soma de certo número de forças mecânicas, físicas e químicas, que se sobrepõem e se influenciam mutuamente. A celulose bacteriana é a mais ordenada do que a celulose padrão, e esta ordem e falta de irregularidades, conduz ao reforço superior e a propriedades de expansão térmicas quando utilizadas com materiais de matriz. As ligações inter e intra-moleculares e/ou aderência são conseguidas através da ligação de hidrogênio. Fibras de celulose bacteriana tem um grau de polimerização de 2000 e 6000 (IGUCHI, 2000). Este grau relativamente baixo de polimerização pode limitar a aderência através de redes interpenetrantes ou mecânicos encravamento e, para a maior parte, a aderência de materiais compósitos está limitada a ligação de hidrogênio que outros mecanismos de adesão devem ser explorados (GARDNER et al., 2008).

Siqueira e Moreschi (2000) referem o desenvolvimento de uma nova tecnologia para obtenção de membrana de celulose desidratada, com poros de tamanhos específicos, solucionando os inconvenientes das coberturas descritas anteriormente e também com das dificuldades encontradas no atual estudo. As membranas porosas celulósicas desidratadas apresentam porosidade criada artificialmente para permitir a remoção espontânea ou estimulada da secreção de

lesões. Tais propriedades possibilitaram vantagens sobre os tratamentos convencionais, traduzidas na prática diária como facilidade de aplicação, excelente adesão aos tecidos, diminuição da dor, visualização adequada do leito da lesão, drenagem espontânea, diminuição ou ausência de trocas de coberturas e aumento no intervalo do acompanhamento médico. Uma importante característica é a resistência e adesão em meio úmido, facilitando a aplicação e garantindo a permanência da cobertura. A porosidade impede bolhas de ar sob a cobertura, bem como a drenagem de secreções sob a cobertura, melhorando a adesão, e reduzindo as trocas de cobertura, quando comparadas às coberturas não porosas (SOBRINHO, 1989).

Os hidrogéis promovem condições fisiológicas adequadas para a cicatrização (KICKHÖFEN et al., 1986). Não são permeáveis às bactérias, deixando, entretanto, passar substâncias como água, proteínas e metabólitos. Os hidrogéis são atóxicos e não possuem propriedades irritantes, além de apresentarem propriedades mecânicas de retenção de água e difusão de proteínas. Têm sido indicados em feridas profundas, nas feridas contaminadas e com grande quantidade de exsudato (ARAÚJO et al., 1994). A natureza macia e emborrachada dos hidrogéis minimiza a irritação no tecido envolvente (ANDERSON; LANGONE, 1999). Todas essas características do hidrogel comprovam o grande sucesso do seu uso em reparação de feridas, como foi para o atual estudo, que promoveu uma reparação mais rápida, teve uma ótima aderência e não demonstrou complicações durante todo o período de cicatrização.

O baixo poder de aderência da pomada de collagenase à ferida, demonstrado no atual estudo especialmente nos primeiros dias de tratamento, pode ser um fator limitante ao emprego da mesma em situações em que a bandagem não pode ser aplicada (RAHAL et al., 2001). Uma vez que a gaze adere à ferida, mesmo usando irrigação durante a sua remoção, pode haver lesão das células epiteliais (SWAIM, 1980). Como a pomada orgânica promoveu uma cobertura não aderente, houve maior proteção no grupo III.

6 CONCLUSÃO

Em relação aos objetivos e metodologia utilizada concluiu-se que:

- Foi possível a obtenção de membrana de celulose com colágeno (membrana CB-COL) como o hidrogel de CB-COL, sendo que a técnica de obtenção da membrana é mais trabalhosa e demorada que o hidrogel;
- As caracterizações confirmaram a incorporação do COL às matrizes de CB por análises de espectroscopia (FT-IR); a difração de raios-X (DRX) não demonstrou alterações no padrão de cristalinidade do hidrogel de CB-COL após a incorporação do colágeno na CB; a análise do MEV demonstrou a presença de colágeno, sendo que os poros ficaram interconectados em todo o material. A presença de COL não alterou estrutura e ligações químicas da CB; as curvas TG/DTG indicam que as amostras apresentam excelentes propriedades térmicas, e que não houve mudança significativa na estabilidade térmica entre elas;
- O hidrogel de CB-COL apresentou resultados mais favoráveis em relação aos outros grupos, pois foi de fácil fixação, manteve o local úmido e não danificou o tecido de granulação;
- A membrana CB-COL mostrou-se uma cobertura de fácil aderência inicialmente, mas sua permanência no leito tornou-se difícil, pois apesar, do material ter resistência durante a sutura, ele não permaneceu no leito após 15 dias. Não houve necessidade de troca desse material, pois ele ressecava e caía naturalmente;
- Os dois materiais a base de CB-COL se apresentaram biocompatíveis.

7 REFERÊNCIAS¹

ABRANTES, A. C. S. **Do avião à urna eletrônica. Fonte: Ministério da Ciência & Tecnologia (jovem).** Disponível em <<http://ctjovem.mct.gov.br>>. Acesso em: 10 dez 2012.

ÁLVARES, S. **Contribuição para o estudo histométrico e histoquímico do processo de reparação de lesões obtidas experimentalmente na pele de ratos albinos.** 1972. 42 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1972.

ALVES, A. L. G. Tendon splitting surgical treatment on experimental equine acute tendonitis. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 45-51, 2002.

AMORIM, W. L.; COSTA, H. O.; DE SOUZA, F. C. et al. Estudo experimental da resposta tecidual à presença de celulose produzida por *Acetobacter xylinum* no dorso nasal de coelhos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 2, p. 200-207, 2009.

ANDERSON, J. M. Inflammatory response to implants. **American Society for Artificial Internal Organs**, v. 11, p. 101-7, 1988.

ANDERSON, J. M.; LANGONE, J. J. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems. **Journal of Controlled Release**, v. 57, p. 107-113, 1999.

ANDREOZZI, G. M.; ANNONI, F.; ATIAROO, S. et al. Bioprocess@ nella terapia dell'ulcera flebostatica. **Minerva Angiology**, v. 17, p. 29-34, 1992.

ARAÚJO, C. F. R.; SOUZA FILHO, Z. A. DE; GRECA, F. H. et al. Efeitos do Agarol e do Trigliceril sobre a cicatrização de pele: estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n. 4, 12 p. São Paulo, 1994.

ARAÚJO, G. F.; ARAÚJO, F. L. S. M.; TORRES, O. J. M. et al. Operatória: coberta ou descoberta? **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 77, p. 17-19, 1987.

ARAÚJO, I. D. Fisiologia da cicatrização. In: PETROIANU, A. **Lições de Cirurgia**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1977. p. 101-109

ARNOLD Jr., H. L.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D. A pele: estrutura básica e função: doenças básicas da pele de Andrews. **Dermatologia Clínica**, p. 1-14, 1994.

AUERSVALD, A. **Estudo comparativo dos efeitos induzidos pela aplicação do laser de CO₂ e do laser de Erbium: Yttrium Aluminum Garnet, em pele de ratos.** 2001. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Médicas, Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, 2001.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

AZEVEDO, R. B. Microscopia eletrônica. In: DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber Editora, 2006. p. 89-108.

BACKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006.

BALAKRISHNAN, B.; MOHANTY, M.; UMASHANKAR, P. R. et al. Evaluation of an *in situ* forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. **Biomaterials**, v. 26, p. 6335–6342, 2005.

BANKS, W. J. Histologia veterinária aplicada. 2. ed. São Paulo: Manole. 1992. cap. 20, p. 391-424.

BARTLETT, R. H. Skin substitutes. **Journal of Trauma**, Baltimore, v. 21, 731 p., 1981.

BARUD, H. S.; BARRIOS, C. E.; MARQUES, R. F. C. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes, materials science & engineering. **Biomimetic Materials, Sensor and Systems**, v. 1, p. 1-2, 2007.

BARUD, H. S. et al. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochimica Acta**, v. 471, n. 1-2, p. 61-69, 2008.

BELL, E. et al. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. **Science**, Washington, v. 211, p. 1052-1054, 1981.

BENDO, L.; CHRISTOFOLETTI, G. B. **Prática: microscopia óptica, microscopia eletrônica e EDX**. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 2007. 30 p.

BENZIMAN, M.; HAIGLER, C. H.; BROWN, R. M. et al. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 11, p. 6678-6682, 1980.

BERNALES, D. M.; CARIDE, F.; LEWIS, A. et al. Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso em técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v. 23, n. 2, p. 65-74, 2004.

BEVILACQUA, R. G. Cicatrização. In: BEVILACQUA, G. S. **Bases da cirurgia**. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1981. p. 99-118.

_____. **Cicatrização: manual do residente de cirurgia**. 2. ed. São Paulo: Pedagógica e Universitária, 1984.

BONACIN, R. F. **Hidrogéis de pvp e blendas de pvp/polianidridos como potenciais curativos para feridas crônicas**. 2011. 192p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2011.

BONZON, N.; CARRAT, X.; DEMINIÈRE, C. New artificial connective matrix made of fibrin monomers, elastin peptides and type I + III collagens: structural study, biocompatibility and use as tympanic membranes in rabbit. **Biomaterials**, v. 16, v. 11, pp. 881-885, 1995.

BORGES, E. L. **Feridas: úlceras dos membros inferiores**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan Ltda., 2012. v. 1. 203 p.

BRITO FILHO, S. B. DE; MATIAS, J. E. F.; STAHLKE JR., H. J. et al. Análise da cicatrização na linha alba com uso de extrato aquoso de *Orbignya Phalerata* (babaçu): estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 76-88, 2006.

BROWN, R. M., Jr.; WILLISON, J. H.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 73, n. 12, p. 4565-4569, 1976.

BURET, A. An *in vivo* model to study the pathology of infectious biofilms on biomaterial surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, New York, v. 25, p. 865-874, 1991.

BURKE, J. F. Observations on the development of an artificial skin: presential address. **Journal of Trauma**, Baltimore, v. 23, n. 7, p.543-551, 1983.

CAIAZZA, S. et al. Evaluation of guided bone regeneration in rabbit femur using collagen membranes. **Implant Dentistry**, v. 9, n. 3, p. 219-225, 2000.

CANNON, C. Z.; KISSLING, G. E.; HOENERHOFF, M. J. Evaluation of dosages and routes of administration of tramadol analgesia in rats using hot-plate and tail-flick tests. **Laboratory Animal**, v. 39, n.11, p. 342-51, 2010.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; PAOLI, A. A. S. Morfologia e anatomia da semente de *Schinus terebinthifolius Raddi* (anacardiaceae) em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 1-12, 1999.

CARVALHO, F. L. S; KOMATSU, D. **Prática: calorimetria diferencial exploratória (DSC) e termogravimetria (TG)**. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, 2007. p. 21.

CASTRO, O. C.; RIBEIRO FILHO, A. S.; NOGUEIRA, V. M. Película celulósica: um substituto temporário de pele. **Hospital das Forças Armadas: publicação técnico-científica**, v. 3, n. 3, p. 209-32, 1988.

CHARLET, E. **Cosmética para farmacêuticos**. Royo, Editorial Acribia, 1996, p. 5-12, 1996.

CHEN, Y. S.; HSIEH, C. L.; TSAI, C. C. et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, Laminin and Fibronectin. **Biomaterials**, v. 21, p. 1541-1547, 2000.

CHEN, J.; LIU, Y.; XIONG, D-Q, et al. Preparation and photochromic behavior of crosslinked polymer thin films containing polyoxometalates. **Thin Solid Films**, v. 516, p. 2864-2868, 2008.

CIENTFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise instrumental**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 66, 2000.

CLARK, R. A. F. **The molecular and cellular biology of wound repaired**. New York: Plenum Press, 611 p., 1996.

CLARK, R. A. Fibrin and wound healing. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 936, p. 355-367, 2001.

COHN, S. M.; LOPEZ, P. P.; BROWN, M. et al. Open surgical wounds: how does aquacel compare with wet-to-dry gauze? **Journal of Wound Care**, v. 13, n. 1, p. 10-12, 2004.

COHEN, K.; MAST, B. A. Models of wound healing. **Journal of Trauma**, v. 30, n. 12, p. 149-155, 1990.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 1031 p., 1986.

COSTA, H. O.; SOUZA, F. C. Avaliação da regeneração tecidual da pele de porco submetida a lesão térmica seguida de colocação de Biotissue®. **Acta ORL - Técnicas em Otorrinolaringologia**, v. 23, n. 3, p. 23-27, 2005.

COSTA, O. R.; VEINSTEN, F. J. **Utilización de colágeno en gránulos en regeneración ósea y periodontal**: modelo experimental y un caso clínico Buenos Aires. Fundación Juan José Carraro. Disponível em: <<http://www.fundacioncarraro.org/revista-2007-n24-art8.php>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. R. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 79-100, 2000

CRAIGHEAD, H. G.; JAMES, C. D.; TURNER, A. M. P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v. 5, n. 2-3, p. 177-184, 2001.

CROCE, M. A.; SILVESTRI, C.; GUERRA, D. et al. Adhesion and proliferation of human dermal fibroblasts on collagen matrix. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 18, n. 3, p. 209-222, 2004.

CROSS, S. E.; NAYLOR, I. L.; COLEMAN, R. A. et al. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 189-197, 1995.

CULLEN, B.; WATT, P. W.; LUNDGYST, C. et al. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 12, p. 1544-1556, 2002.

CUNHA, M. R.; SANTOS JR., A. R.; GENARI, S. C. Cultura de osteoblastos sobre membranas de colágeno polianiónico: avaliação preliminar do potencial de indução da formação de tecido ósseo visando reparação tecidual. **Boletim de Medicina Veterinária**, Espírito Santo do Pinhal: UNIPINHAL SP, v. 1, n. 1, p. 73-85, 2005.

CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S. et al. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 7, p. 145-151, 2006.

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

DEAN, Jr. et al. **Weighted collagen micro sponge for immobilizing bioactive material**. US 4997753, 24 jun. 2003.

DEE, K. C.; ANDERSEN, T. T.; BIZIOS, R. Design and function of novel osteoblast adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 40, n. 3, p. 371-377, 1998.

DE PAOLA, D. Q.; SOUZA, M. G. P. P. Membrana celulósica: novo curativo biológico para melhora do leito receptor de enxertia cutânea. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 77, n. 3, p. 135-138, 1987.

DESAI, M. H. et al. Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, Galveston, v. 12, n. 6, p. 540-545, 1991.

DORMER, K. J.; BRYCE, G. E.; HOUGH, J. V. D. Selection of biomaterials for middle and inner ear implants. **Clinical Otolaryngology**, North Am., v. 28, n. 1, p. 17-27, 1995.

DUYNSTEE, M. L.; VERWOERD-VERHOEF, H. L. et al. The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 110, n. 4, p. 1073-9, 2002.

EL FRAY, M.; PILASZKIEWICZ, A.; SWIESZKOWSKI, W. et al. Morphology assessment of chemically modified cryostructured poly (vinyl alcohol) hydrogel. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 2035-2040, 2007.

ESPEY, L. L. Ovulation as an inflammatory reaction: a hypothesis. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 73-106, 1980.

EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; GONÇALVES, G.F. et al. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*). **Veterinária Notícias**, v. 4, n. 1, p.77-82, 1998.

FALCÃO, S. C. et al. Processo modificado de reprodução e amplificação de imagem para mensuração de área por planimetria: aplicação em feridas planas produzidas em cães, tratadas por curativos oclusivos de pele de rã. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 38, n. 4, pp. 165-169, 2001.

FERRY, J. D. **Viscoelastic properties of polymers**. New York, p. 486-544, 1980.

FILADELPHO, A. L. **Análise da reação tecidual às inclusões subcutâneas de matriz de colágeno liofilizada no dorso de ratos Wistar tratados com aloe vera**. 2009. 68 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. 2009.

FRANKE, M. **Biomateriais**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 99 p., 2003.

FREDEL, M. C.; BARRA, G. **Tópicos especiais: biomateriais**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2004.

FUGAZZOTTO, P. A. GBR using bovine matrix and resorbable and non resorbable membranes. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Chicago, v. 23, n. 4, p. 361-367, 2003.

GABBIANI, G.; MAJNO, G. Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? a ultrastructural study. **American Journal of Pathology**, v. 66, p. 131-138, 1972.

GARDNER, D. J.; OPORTO, G. S.; MILLS, R. et al. Adhesion and surface issues in cellulose and nanocellulose. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 22, p. 545-567, 2008.

GEORGE, A. V. A. FTIRS in H₂O demonstrates that collagen monomers undergo a conformational transition prior to thermal self-assembly in vitro. **Biochemistry**, v. 30, pp. 2372-2377, 1991.

GILBERT, D. L. et al. Macromolecular diffusion through collagen membranas. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 47, p. 79-88, 1988.

GIRARDI, R. C. G. **Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato**. 2005. 101 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Carlos.

GOERTZ, O.; RING, A.; KNIE, U. et al. Evaluation of a novel polihexanide-preserved wound covering gel on dermal wound healing. **European Surgical Research**, v. 44, p. 23-29, 2010.

GOISSIS, G.; GÓES, J. C. Géis de colágeno aniônico: ransana como biomateriais. Preparação e caracterização físico-química. **Polímeros**, Brasil, v. 3, n. 3, p. 32-39, 1997.

GOKOO, C.; BURHOP, K. A. A Comparative study of wound dressings on full thickness wounds in micropigs. **Decubitus**, v. 6, n. 5, p. 42-43/46, 1993.

GOTTLOW, J.; LAURELL, L.; LUNDGREN, D. et al. Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device: a longitudinal study in monkeys. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, Chicago, v. 14, p. 436-449, 1994.

GRANDE, C. J. et al. Development of Self-assembled bacterial cellulose-starch nanocomposites. **Materials Science and Engineering**, v. 29, n. 4, p. 1098-1104, 2009.

GULREZ, S. K. H.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O. Hydrogels: methods of preparation, characterization and applications. In: CARPI, A. **Progress in molecular and environmental bioengineering: from analysis and modeling technology applications**. NewYork: InTech, 2011. p. 117-150.

GUPTA, A.; KUMAR, R.; UPADHYAY, N. K. et al. Synthesis, characterization and efficacy of chemically crosslinked pva hydrogels for dermal wound healing in experimental animals. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, p. 1400–1408, 2009.

HART, J.; SILCOCK, D.; GUNNIGLE, S. et al. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in wound repair: effects *in vitro* on fibroblast biology and *in vivo* in a model of compromised healing. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 12, p. 1557-1570, 2002.

HE, A.; FU, Y. ; LI, H. Artificial biological skin for preventing adhesion of repaired tendon in white rats, **Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 22, n. 4, p. 287-290, 1997.

HEIPLE, J. M.; WRIGHT, S. D.; ALLEN, N. S. et al. Macrophages form circular zones of close apposition to IgG-coated Surfaces. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 15, p. 260–70, 1990.

HELENIUS, G.; BACKDAHL, H.; BODIN, A. et al. *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76, n. 2, p. 431-438, 2006.

HERMANS, M. H.; HERMANS, R. P. Duoderm, an alternative dressing for smaller burns. **Burns Including Thermal Injury**, v. 12, p. 214-219, 1986.

HERRMANN, J.B.; WOODWARD, S.C.; PULASKI, E.J. Healing of colonic anastomosis in the rat. **Surgery, Gynecology & Obstetrics**, v. 119, p. 269-75, 1964.

HILÁRIO, A. H.; VASQUEZ, L. A. M. Utilização de um substituto temporário da pele nas perdas cutâneas de pacientes ambulatoriais. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 78, p. 393-398, 1988.

HO, H. O.; LIN, L. H.; SHEU, M. T. Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as drug carrier. **Journal of Controlled Release**, v. 44, p. 103-112, 1997.

HOENICH, N. Cellulose for medical applications: past, present, and future. **BioResources**, v. 1, n. 2, p. 270-280, 2006.

HÖGSET, O.; BREDBERG, G. Plaster of Paris: thermal properties and biocompatibility. **Acta Otolaryngol**, v. 101, p. 445-52, 1986.

HUSAIN, M. T.; AKHTAR, M.; AKTHAR, N. Report on evaluation of hydron as burn wound dressing. **Burns**, v. 9, p. 330–334, 1983.

IAMAGUTI, L. S. **Utilização de membrana biossintética de celulose em troclopastia experimental em cães**. 2007. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose: a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, p. 261–270, 2000.

IRION, G. L. **Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores**. Tradução João Clemente Dantas do Rego Barros. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 390 p.

JOHNSTON, D. E. Wound healing in skin: the veterinary clinics of North America. **Small Animal Practice**, v. 20, n. 1, p. 1-25, 1990.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 101-106, 1998.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas**. Ed. Atheneu, 2005. p. 3-41.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. cap. 18, p. 271.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 427 p.

KANANI, A. G.; BAHRAMI, S. H.; TAFTEI, H. A. et al. Effect of chitosan-polyvinyl alcohol blend nanofibrous web on the healing of excision and lincision full thickness wounds. **IET Nanobiotechnol**, v. 4, n. 4, p. 109–117, 2010.

KANE, J. B.; TOMKINS, R. G.; YARMUSH, M. L. et al. Burn dressings. In: RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J. et al. **An introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic, 1996. p. 360–370.

KANGESU, T. et al. Kerato-dermal grafts: the importance of dermis for the in vivo growth of cultured keratinocytes. **British Journal of Plastic Surgery**, Edinburgh, v. 46, n. 5, p. 401-409, 1993.

KASHYAP, A.; BEEZHOLD, D.; WISEMAN, J. et al. Effect of povidone Iodine dermatologic ointment on wound healing. **The American Surgeon**, v. 61, n. 6, p. 486-491, 1995.

KASHYAP, N.; KUMAR, N.; RAVI KUMAR, M. N. V. Hydrogels to pharmaceutical and biomedical application. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, New York, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2005.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KENNEDY, D. Luminescência biológica, em: **A célula viva** (Texto do Scientific American), (1969), Editora da USP, Editora Polígono: São Paulo, p. 126-139, 1969.

KICKHÖFEN, B.; WOKALEK, H.; SCHEEL, D. et al. Chemical and physical proprieties of a hydrogel wound dressing. **Biomaterials**, v. 7, n. 1, p. 67- 62, 1986.

KIM, B. S.; MOONEY, D. J. Development of biocompatible syntetic extracellular matrices for tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 224-229, 1998.

KING, W. W.; LAM, P. K., LIEW, C. T. et al. Evaluation of artificial skin (Integra) in a rodent model. **Burns**, v. 23, p. 30-32, 1997. Supplement 1.

KIRSNER, R. S.; EAGLSTEIN, W. H. The wound healing process. **Dermatologic Clinics**, v. 11, n. 4, p. 629–40, 1993.

KMOLL, M. Aufladepotential und sekundäremission elektronenbestrahlter körper. **Zhurnal Tekhnicheskoi Fiziki**, v. 16, p. 467-475, 1935.

KREMER, M.; LANG, E.; BERGER, A. C. Evaluation of dermal-epidermal skin equivalents ('composite-skin') of human keratinocytes in a collagenglycosaminoglycan matrix (integra artificial skin). **British Journal of Plastic Surgery**, v. 53, p. 459-65, 2000.

KUMARI, T. V.; VASUDEV, U.; KUMAR, A. et al. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. **Trends in biomaterials and artificial organs**, v. 15, n. 2, p. 37-41, 2002.

LAUTO, A., MAWAD, D., BARTON, M. et al. Photochemical tissue bonding with chitosan adhesive films. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 9, 47, 11 p, 2010.

LAZARUS, G. S.; BROWN, R. S.; DANIELS, J. R. et al.. Human granulocyte collagenase. **Science**, v. 159, p. 1483-1485, 1968.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1, p. 1-22, 2001.

LLOYD-EVANS, M. Regulating tissue engineering. **Materials Today**, v. 7, p. 48-53, May: 2004.

MA, P. X.; ZHANG, R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix, **Journal of Biomedical Materials Research.**, New York, v. 46, n. 1, p. 60-72, 1999.

MACEDO, L. R. **Emprego de membrana de celulose microfibrilar na ceratoplastia lamelar em coelhos (*O. cuniculus*, LINNAEUS, 1758) : aspectos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos.** 2008. 79 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

MACGRATH, M. H.; SIMON, R. H. Wound geometry and the kinetics of wound contraction. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 72, n. 1, p. 66-73, 1983.

MAGALHÃES, M. S. F.; FECHINE, F. V.; MACEDO, R. N. et al. Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 23, p. 262–269, 2008.

MAIA, M. B. S. **Estudo da atividade anti-inflamatória e outros efeitos farmacológicos de *Orbignya phalerata*.** 1987. 57 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 1987.

MAYALL, R. C. Tratamento das úlceras tróficas dos membros com um novo substituto de pele. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v. 80, p. 41-7, 1990.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.

MANSUR, H. S.; OREFICE, R. L.; MANSUR, A. A. P. Characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. **Polymer**, v. 45, p. 7193-7202, 2004.

MARTINS, N. L. P.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J. M. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *orbignya phalerata* (babaçu): estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 66-75, 2006. Suplemento 3.

MASINI, E.; CALAMO, M. A. Uma forma de tratamento de lesões cutâneas com papaína e sacarose. **Revista Brasileira de Clínica Terapêutica**, v. 15, n. 8., p. 245-247, 1986.

MASOKO, P.; PICARDI, J.; HOWARD, R. L. et al. *In vivo* antifungal effect of combretum and terminalia species extracts on cutaneous wound healing in immunosuppressed rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 6, p. 621–632, 2010.

MATEOS, S. B. **Pele descartável**. Indústria brasileira, 2004. p. 38-41.

MATOS, D. S. **Avaliação do efeito cicatrizante de diferentes formulações fitoterápicas do extrato de repolho (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) em coelhos**. 2008. 45 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Vale do Rio Doce, 2008.

MCFARLANE, R. M.; DEYOUNG, G.; HENRY, R. A. The desing of a pedide flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plastic, Reconstructive & Surgery**, v. 35, p. 177-182, 1965.

MELLO, L. R.; MACHADO, F. C. N.; HAAS, L. J. et al. Efeitos hemostático e estrutural da esponja de cellulose liofilizada. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 3B, p. 613-620, 1998.

MENSAH, A. Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, P. J. et al. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219–226, 2001.

MESQUITA, L. A. F. **Estudo da cicatrização cutânea causada pelo laser de CO₂ ultrapulsado em retalho dorsal de ratos**. 2002. 96 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Médicas, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, 2002.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 5, pp. 31–39, 1985.

MEZADRI, T. J.; LEITE, M. F.; STAACK JR., M. C. et al. Evaluation of the contraction of cutaneous wounds in Wistar rats treated with brazilian green propolis gel. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 28, n. 5, p. 762-767, 2009.

MILLER, J. M. Evaluation of a new surgical suture (prolene). **American Journal of Surgery**, v. 39, p. 31-39, 1973.

MIRANDA, L. T. G. S. **Uso da tintura de arnica em feridas cutâneas abertas em ratos**. 2001. 38 p. Dissertação (Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001.

MODOLIN, M.; BEVILACQUA, R. G.; RUY, G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, v. 14, n. 6, p. 208-13, 1985.

MOIEMEN, N. S.; STAIANO, J. J., OJEH, N. O. et al. Reconstructive surgery with a dermal regeneration template: clinical and histologic study. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 108, p. 93-103, 2001.

MORAIS, G. F.; OLIVEIRA, S. H.; SOARES, M. J. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 17, p. 98-105, 2008.

MOSELEY, R.; WALKER, M.; WADDINGTON, R. J. et al. Comparison of the antioxidant properties of wound dressing materials-carboxymethylcellulose, hyaluronan benzyl ester and hyaluronan, towards polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species. **Biomaterials**, v. 24, n. 9, p. 1549-1557, 2003.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais**. 1. ed. Artliber, 2009, p. 29.

MUHART, M.; MCFALLS, S.; KIRSNER, R. S. et al. Behavior of tissue-engineered skin: a comparison of a living skin equivalent, autograft, and occlusive dressing in human donor sites. **Archives of Dermatology**, v. 135, p. 913-918, 1999.

MURCH, A. R.; GROUNDS, M. D.; MARSHALL, C. A. et al. Direct evidence that inflammatory multinucleate cells form by fusion. **Journal of Pathology**, v. 137, p. 177-80, 1982.

MURPHY, P. Starch. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WILLIAMS, P. A. eds. **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge: CRC Press, 2000. p. 41-66. (Woodhead Publishing Series in Food Science).

NATHAN, P.; MACMILLAN, B. G.; HOLDER, I. A. *In situ* production of a synthetic barrier dressing for burn wounds in rats. **Infection and Immunity**, v. 12, p. 257-60, 1975.

NAYAK, B. S. *Cecropia peltata* L (Cecropiaceae) has wound-healing potential: a preclinical study in a sprague dawley rat model. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 5, n. 20, 8 p, 2006.

NEMETZ, A.; TÓTH, M. et al. Allelic variation at the interleukin 1beta gene is associated with decreased bone mass in patients with inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 49, n. 5, p. 644-9, 2001.

NINMI, M. E. **Collagen**. 3. ed. Florida: CRC Press, 1988, p. 1-38.

NUNES Jr., J. A. T.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O. et al. Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius raddi* (aroeira) no processo de cicatrização da linea alba de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 8-15, 2006. Suplemento 3.

O'BRIEN, F. J.; HARLEY, B. A.; YANNAS, I. V. et al. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, p. 433-441, 2005.

OLIVEIRA, H. P. Traumatismos nos animais domésticos. **Cadernos Técnicos da Escola de veterinária da UFMG**, v. 1, n. 7, p. 1-57, 1992.

OLIVEIRA, S. T. de; LEME, M. C.; PIPPI, N. L. et al. Formulações de confrei (*Symphytum Officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, v. 7/8, n.1, p. 65-74. 2001.

OLIVEIRA, S. H. dos S.; SOARES, M. J. G. O.; ROCHA, P. de S. Uso de cobertura com colágeno e aloevera no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 346-351, 2010.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, c.16, p. 479-506, 2006.

ORGILL, D. P.; SKRABUT, E. M. Would tissue can utilize a polymeric template to synthesize a functional extension of skin. **Science**, v. 215, p. 174-176, 1982.

ORGILL, D. P.; BUTLER, C.; REGAN, J. F. Behavior of collagen-gag matrices as dermal eplacement in rodent and porcine models. **Wounds**, v. 8, p. 151-157, 1996.

OSMAN, S. A.; SOUZA, F. C.; DOLCI, J. E. Estudo experimental sobre a aplicação de película de celulose (Bionext®) em área cruenta de ressecção de concha nasal de coelhos. **Acta ORL/Técnicas em Otorrinolaringologia**, v. 25, n. 4, pp. 304-311, 2007.

OWENS, N. Use of pressure dressings in the treatment of burns and other wounds. **Surgical Clinics of North America**, v.23, p. 1354-66, 1943.

PANERARI, Â. C. D.; COSTA, H. O.; SOUZA, F.C. et al. Avaliação da resposta inflamatória traqueal ao curativo de celulose bacteriana após escarificação cirúrgica em coelhos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 4, p. 512-22, 2008.

PARK, J. **Biomaterials science and engineering**. New York: Plenum Press, 1984. p. 1-10

PÉRTILE, R. A. N. **Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos I929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. 2007. 79 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

MURPHY, P. Starch. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A.; WILLIAMS, P. A. eds. **Handbook of hydrocolloids**. Cambridge: CRC Press, 2000. p. 41-66. (Woodhead Publishing Series in Food Science)

PINHEIRO, A. L. B.; MEIRELES, G. C. S.; CARVALHO, C. M. et al. Biomodulative effects of polarized light on the healing of cutaneous wounds on nourished and undernourished wistar rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 5, p. 616–624, 2006.

PITANGUY, I. Utilização de película de celulose (biofill) como curativo biológico. **Revisa Brasileira de Cirurgia**, v. 78, n. 5, p. 317-26, 1988.

PURNA, S. K.; BABU, M. Collagen based dressing: a review. **Burns**, v. 26, p. 54-62, 2000.

RAO, K. R.; PANDURANGA, K.; NAGARAJAN, B. et al. Grafting of poly (vinylpyrrolidinone) onto gelatin and its application as synthetic plasma ex-pander. **European Polymer Journal**, v. 21, n. 2, p. 195-199, 1985.

RAHAL, S. C.; ROCHA, N. S.; BLESSA, É. P. et al. Pomada orgânica natural ou solução salina isotônica no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1007-1011, 2001.

RAMAKRISHNA, S. F.; TEO, K.; LIM, W. E. et al. **An introduction to electrospinning and nanofibers**. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2005. 382 p.

RAZZAK, M. T.; DARWIS, D.; ZAINUDDIN, S. Irradiation of polyvinyl alcohol and polyvinyl pyrrolidone blended hydrogel for wound dressing. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 62, p. 107-113, 2001.

REED, J. C.; CARDONE, M. H.; ROY, N. et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. **Science**, v. 282, n. 5392, p. 1318-1321, 1998.

GENNARO, A. R. **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 862-884.

ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1268 p.

ROBSON, M. C.; BURNS, B. F.; SMITH, D. J. Jr. Acute management of the burned patient. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 89, p. 1155-1168, 1992.

ROSIK, J. M.; YOSHII, F. Hydrogels and their medical applications. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 151, p. 56-64, 1999.

ROSSI Jr., W. C.; BARBOSA, L. C. De O.; ESTEVES, A. Avaliação do potencial osteogênico do periósteo em associação com uma membrana de colágeno. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 18, n. 6, p. 1-9, 2010.

RUE, L. W. et al. Wound closure and outcome in extensively burned patients treated with cultured autologous keratinocytes. **Journal of Trauma**, Baltimore, v. 34, n. 5, p. 662-668, 1993.

RUSZCZAK, Z.; SCHWARTZ, R. A. Modern aspects of wound healing: an update. **Dermatologic Surgery**, v. 26, pp. 219-229, 2000.

SALAMAT-MILLER, N.; MONTAKARN, C.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, v. 57, p. 1666-1691, 2005.

SAMPAIO, S.; RIVITTI, A. P.; EVANDRO, A. **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 3-43.

SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGROJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R. et al. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 4, p. 1194-1199, 2006.

SANCHEZ, F. **Avaliação do processo de reparação tecidual em úlceras crônicas utilizando curativos de celulose bacteriana associados ou não à laserterapia**. 2012. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

SANCHEZ NETO, R. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, p. 18-23, 1993.

SANINO, A.; DEMITRI, C.; MADAGHIELE, M. Biodegradable cellulose-based hydrogels: design and applications. **Materials**, Lecce, v. 2, n. 1, p. 353-373, 2009.

SANTOS, V. L. C. G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. In: DUARTE, Y. A. O.; DIOGO, M. J. D. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 265-306.

SANTOS, A. L. **Avaliação de membrana experimental implantada em cavidade cirurgicamente confeccionada em calota craniana de coelhos: estudo histológico**. 2010. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

SASKA, S. **Materiais compósitos orgânico-inorgânicos a base de celulose bacteriana com peptídeos regulatórios de fatores de crescimento, OGP e OGP [10-14], para regeneração óssea**. 2011. 257 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.

SASKA, S.; TEIXEIRA, L. N.; OLIVEIRA, P. T. et al. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 22102–22112, 2012.

SAXENA, I. M.; BROWN, R. M. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. **Annals of Botany**, v. 96, pp. 9-21, 2005.

SEVASTJANOVA, N. A.; MANSUROVA, L. E.; DOMBROVSKA, L. E. et al. Biochemical characterization of connective tissue reaction to synthetic polymer implants. **Biomaterials**, v. 8, n. 4, p. 242-247, 1987.

SILVA, C. M. P.; ROCH, R. M.; MORENO, J.S. O Babaçu (*Orbignya phalerata*) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente de cromoblastomicose no estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 49-52, 1995.

SIMÕES, M. J.; CABRAL, A. C. V.; BOYACIYAN, K. et al. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Revista Paulista de Medicina**, v. 104, p. 132-135, 1986.

SIMÕES, M. L. P. Cicatrização. In: SILVA Jr., O. C.; ZUCOLOTO, S.; BEER Jr., A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Robe Editorial, 1988. p. 266-273.

SIQUEIRA, J. J. P.; MORESCHI, J. C. Membranas de celulose porosas desidratadas para curativos em úlceras, escoriações e queimaduras. **Revista da Sociedade Brasileira de Angiologia e de Cirurgia Vascular**, v. 16, n. 5, p. 179-180, 2000.

SOBRINHO, A. G. Uma película celulósica no tratamento de queimaduras de I e II graus. **Revista brasileira de cirurgia**, v. 79, n. 1, p. 45-51, 1989.

STEPHEN, T. **Semipermeable film dressings in wound management and dressings**. London: The Pharmaceutical Press, 1990. p. 25-34, 1990.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001. 416 p.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T. et al. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.

SWAIM, S. F. **Surgery of traumatized skin: management and reconstruction in the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1980. p. 70-115.

SWAIM, S. F.; HENDERSON, R. A.; FOWLER, D. Small animal wound management. **Veterinary Surgery**, v. 27, n. 2, 158 p., 1998.

SYLVESTER, M. F.; YANNAS, I. V.; SALZMAN, E. W. et al. Collagen banded fibril structure and the collagen-platelet reaction. **Thrombosis Research**, v. 55, p. 135-148, 1989.

SZCZESNIAK, L.; RACHOCKI, A.; TRITT-GOC, J. Glass transition temperature and thermal decomposition of cellulose powder. **Cellulose**, v. 15, n. 3, p. 445-451, 2008

TABATA, Y. The importance of drug delivery systems in tissue engineering. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 80-89, 2000.

TABATA, Y. Recent progress in tissue engineering. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 6, n. 1, p. 483-7, 2001.

TEO, T. C.; NAYLOR, I. L. Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 48, n. 4, p. 198-202, 1995.

THAKARE, V. M. International standard serial number, promotion of cutaneous wound healing by herbal formulation containing *Azadirachta indica* and *Cynodon dactylon* extract in Wistar rats. **International Journal of Pharmaceutical Research & Development**, v. 3, n. 4, p. 80-86, 2011.

THORNTON, F. J.; BARBUL, A. E. Cicatrização no trato gastrointestinal. In: BARBUL, A. E. **Clínicas cirúrgicas da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. p. 546-570.

THORNTON, P.R. **Scanning electron microscopy: applications to materials and device science**. London: Chapman and Hall, 1968. 368 p.

TIAGO, F. **Feridas: etiologia e tratamento**. 2. ed. Ribeirão Preto: FAEPA, 1995. 161 p.

TOGNINI, J. R. F.; FAGUNDES, D. J.; NOVO, N. F. et al. Estudo biomecânico e morfológico da cicatrização da parede abdominal sob ação de meloxicam. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, p. 146-155, 2000.

TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. Obtenção e caracterização de blendas colágenoquitosana. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 943-948, 2002.

TORRES, R.; USALL, J.; TEIXIDO, N. et al. Liquid formulation of the biocontrol agent candida sake by modifying water activity or adding protectants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 330-339, 2003.

TSUBOI, R.; RIFKIND, D. B. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing impairing db/db mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 172, pp. 245-251, 1990.

TURNER, T. D. Semioclusive and occlusive dressings. In: RYAN, T. **An environment for healing: the role of occlusion**. London: Royal Society of Medicine, 1984 (Royal Society of Medicine International Congress and Symposium Series, 88).

VIIDIK, A.; VUUST, J. **Biology of collagen**. London, UK Academic Press, 1980. v. 1.

VILELA, D. D. **Hidrogel de carboximetilcelulose de sódio e própolis: desenvolvimento e caracterização**. 2010. 55 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC da Universidade de São Paulo. 2010.

VINCE, D. G.; HUNT, J. A.; WILLIAMS, D. F. Quantitative assessment of the tissue response to implanted biomaterials. **Biomaterials**, v. 12, p. 731-736, 1991.

VOGT, P.M.; ANDREE, C.; BREUING, K. et al. Dry, moist and wet skin wound repair. **Annals of Plastic Surgery**, v. 34, n. 5, p. 493-500, 1995.

VULCANI, V. A. S. **Obtenção e processamento de matrizes tridimensionais de colágeno e implantação em parede abdominal de eqüinos**. 2008. 93 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

VULCANI, V. A. S.; MACORIS, D. G.; PLEPIS, A. M. G. et al. Obtenção, caracterização e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de eqüinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 778-785, 2008.

_____. Membranas biológicas homólogas preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98% e por liofilização para implantação em eqüinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1329-1334, 2008.

WALDORF, H.; FEWKES, J. Wound healing. **Advances in Dermatology**, v. 10, p. 77-96, 1995.

WAN, Y. Z.; HUANG, Y.; YUAN, C. D. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. **Material Science and Engineering**, v. 27, p. 855-864, 2007.

WANG, H. L.; MACNEIL, R. L. Guided tissue regeneration, absorbable barriers. **Dental Clinics of North America**, v. 42, n. 3, p. 505-522, 1998.

WASSERMANN, D. et al. Preliminary clinical studies of a biological skin equivalent in burned patients. **Burns**, Guildford, v. 14, n. 4, p. 326-330, 1988.

WEBER, D. E.; SEMAAN, M. T.; WASMAN, J. K. et al. Tissue-engineered calcium alginate patches in the repair of chronic chinchilla tympanic membrane perforations. **Laryngoscope**, v. 116, p. 700-4, 2006.

WENDLAND, W. W. M. **Thermal analysis**. 3. ed. New York, John Wiley, 1986. p. 1-86.

WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, v. 185, p. 117-118, 1960.

WIEMAN, T. J. Introduction to care of chronic wounds. **American Journal of Surgery**, New York, v. 176, n. 2, p. 15-25, 1998. Supplement 1.

WIGGINS, M. J.; WILKOFF, B.; ANDERSON, J. M. et al. Biodegradation of polyether polyurethane inner insulation in bipolar pacemaker leads. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 58, p. 302-7, 2001.

WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v. 193, p. 293-294, 1962.

WINTER, G. D.; SCALES, J. T. The effect of air drying and dressings on the surface of a wound. **Nature**, v. 197, p. 91, 1963.

WINTER, G. D. In: MAIBACH, H. I.; ROVEE, D. T. **Epidermal wound healing**. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1972. 71 p.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. In: BARBUL, A. **Clínicas cirúrgicas da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. v. 3, p. 509-527

YAGUISHITA, N. Avaliação da cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa depois da retirada total da pele em dorso de ratos. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 2, p. 193-194, 2007.

YAMADA, A. L. M.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A. et al. Comparação de diferentes doses de collagenase em modelo de indução de tendinite para eqüinos: estudo clínico e ultra-sonográfico. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1124-1130, 2009.

YANNAS, I. V.; BURKE, J. F. The intermingle transplantation of auto and homografts in severe burns. **Burns**, Guildford, v. 6, n. 3, pp. 141-145, 1980.

ZACHARIAS, D. P. M. et al. Efeito da nutrição protéica sobre a resposta cicatricial ao trauma: aspectos histológicos, histoquímicos e contração cicatricial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 6, pp. 97-102, 1991.

ZHANG, L. J. et al. Hydroxyapatite/collagen composite materials formation in simulated body fluid environment. **Materials Letters**, v. 58, n. 5, p. 719-722, 2004.

ZHANG, Z.; LEE, J. H.; LEE, S. H. et al. Morphology, thermal stability and rheology of poly (propylene carbonate)/organoclay nanocomposites with different pillaring agents. **Polymer**, v. 49, n. 12, p. 2947-2956, 2008.

ZHAO, Q.; TOPHAM, N. S.; ANDERSON, J. M. et al Foreign body giant cells and polyurethane biostability: *in vivo* correlation of cell adhesion and surface cracking. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 25, pp. 177-83, 1991.

ANEXO – Protocolo do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

Protocolo CEP/FCF/CAr nº 16/2011

Pesquisador: PAULA RODRIGUES FONTES DE SOUSA MORAES

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar – FO/CAr

Projeto: Estudo comparativo da membrana e gel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos

Parecer nº 12/2011 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Estudo comparativo da membrana e gel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos", apresentada pela mestrande Paula Rodrigues Fontes de Sousa Moraes (Programa de Pós-graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC/USP), sob orientação do Profa. Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em outubro de 2011, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 08 de julho de 2011.

Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA