



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA

JAIURTE GOMES MARTINS DA SILVA

ESTUDO QUÍMICO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA E
DA SUA TOXICIDADE LOCAL, RENAL E HEPÁTICA EM RATOS
WISTAR

RECIFE
2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL – PPGBA**

JAIURTE GOMES MARTINS DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA E
DA SUA TOXICIDADE LOCAL, RENAL E HEPÁTICA EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a Dr^a Flávia Cristina Morone Pinto

Prof^a Valéria Wanderley Teixeira

RECIFE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586e Silva, Jaiurte Gomes Martins
Estudo químico do hidrogel de celulose bacteriana e da sua toxicidade local, renal e hepática em ratos Wistar / Jaiurte Gomes Martins Silva. - 2020.
60 f. : il.
- Orientador: Alvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Coorientadora: Flavia Cristina Morone Pinto.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. Ratos Wistar. 2. Celulose bacteriana. 3. Histomorfometria. 4. Rim. 5. Toxicidade. I. Teixeira, Alvaro Aguiar Coelho, orient. II. Pinto, Flavia Cristina Morone, coorient. III. Título

CDD 636.089

JAIURTE GOMES MARTINS DA SILVA

**ESTUDO QUÍMICO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA E
DA SUA TOXICIDADE LOCAL, RENAL E HEPÁTICA EM RATOS
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Aprovado em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) - UFRPE

Prof.^a Dr.^a Maria Juliana Gomes Arandas - FNH

Prof.^a Dr.^a Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Prof. Dr. Olávio Campos Júnior – Faculdade de Medicina de Olinda (FMO)

RECIFE

2020

**Dedico esta dissertação à Deus, a
minha esposa, filho e avó.**

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço à Deus por cuidar tão bem de mim e da minha família. Agradeço a ti Deus Pai, Filho e Espírito Santo.

Aos meus familiares, em especial a minha amada esposa Glícia e nosso adorado filho Davi, que com seu sorriso nos une e fortalece todos os dias nosso amor. Minha Bisavó das Dores, que me educou, cuidou e se doou com muito amor. Meus pais, Joseneide e Jailton que sempre torceram por mim, a minha vó Mariinha, meus tios e primos. Agradeço aos familiares que já se encontram na casa do pai, mas que deixaram muitas saudades por aqui. Amo muito vocês!

A Professora Flávia Morone, que me orientou como monitor, nas pesquisas, no TCC, na dissertação e principalmente na vida. O professor e pesquisador que me tornei, devo a senhora, amada mestra.

Ao Professor Álvaro pela oportunidade concedida no mestrado e agora também no doutorado, meus agradecimentos.

Também agradeço aos amigos que fiz na UFPE, principalmente no CAV, minha escola. A Juliana Arandas pelas oportunidades e amizade. Ewerton, René, André, Professor Vanildo, Olávio e tantos outros que sempre pude contar. Um agradecimento especial ao laboratório de Anatomia, minha casa.

Aos colegas de laboratório LABEMOVI pela acolhida e colaboração, em especial Ismaela, que não mede esforços para ajudar.

A todos os professores e colegas que fiz na FAST, pela confiança depositada em mim.

A UFRPE, ao PPGBA e a todos que contribuíram na minha formação de mestrado de forma direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

**Somos todos visitantes deste tempo,
deste lugar. Estamos só de passagem.
Nosso objetivo é observar, aprender,
crescer e amar... E depois vamos para
casa.**

Provérbio Aborígine

RESUMO

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o polímero orgânico mais abundante na natureza e forma a base estrutural da parede celular das plantas, sendo produzida também por outros organismos como fungos, algas e algumas bactérias. A celulose bacteriana (CB) apresenta características importantes que combinam várias propriedades superficiais e macromoleculares, essenciais para aplicações *in vitro* e *in vivo*. A bactéria utilizada, produtora do polissacarídeo, foi a *Zoogloea* sp., que foi transferida para um meio esterilizado, consistindo de melaço de cana-de-açúcar. As culturas foram incubadas a 30 °C durante sete dias, formando na interface ar-líquido um material semelhante a um gel. O hidrogel foi analisado quanto à sua composição e testado para esclarecer os efeitos adversos locais, como inflamações, e sistêmicos, a exemplo de infecção, emaciação, vermelhidão e eliminação do material enxertado, causados pelo produto de celulose bacteriana a 0,8% após o implante subcutâneo em 24 fêmeas e 24 machos ratos *Wistar*, de 55 dias de idade. Para isso, foram utilizadas análises químicas, bioquímicas e histomorfométricas que trouxeram resultados dos 20 dias experimentais. Não foram observados comportamento anormal ou sinais clínicos de toxicidade crônica ou inflamação nos ratos tratados. Não houve alteração nos níveis de biomarcadores de lesão hepática (ALT, AST e ALP), na histologia renal, onde se fez avaliação a procura de sinais de lesão celular tubular, dano glomerular ou vascular, nem na morfometria renal, onde foram quantificados os corpúsculos renais e a área do espaço capsular. Concluindo que a ausência de sinais e sintomas de toxicidade sugere que injeções subcutâneas ou intraperitoneais desses polímeros possam ser utilizadas em situações clínicas.

Palavras-chave: Ratos *Wistar*, Celulose bacteriana, Histomorfometria, Rim, Toxicidade.

ABSTRACT

Cellulose (C₆H₁₀O₅) is the most abundant organic polymer in nature and forms the structural base of the cell wall of plants, and is also produced by other organisms such as fungi, algae, and some bacteria. Bacterial cellulose (BC) has important characteristics that combine several surfaces and macromolecular properties, essential for in vitro and in vivo applications. The bacteria used to produce the polysaccharide was *Zoogloea* sp., which was transferred to a sterile medium, consisting of sugar cane molasses. The cultures were incubated at 30 °C for seven days, forming a gel-like material at the air-liquid interface. The hydrogel was analyzed for its composition and tested to clarify the local, such as inflammation, and systemic adverse effects, such as infection, emaciation, redness, and elimination of the grafted material, caused by the 0.8% bacterial cellulose product after subcutaneous implantation in 24 females and 24 male Wistar rats of 55 days old. For this, chemical, biochemical and histomorphometric analyses were used, which brought results from the 20 experimental days. No abnormal behavior or clinical signs of chronic toxicity or inflammation were observed in the treated rats. There was no change in liver injury biomarker levels (ALT, AST and ALP), as well as in renal histology, where it was evaluated to signs of tubular cell injury, glomerular or vascular damage, and renal morphometry, in which it was quantified the number of renal corpuscles, the number of cells per glomerulus and the capsular space area. In conclusion, the absence of signs and symptoms of toxicity suggests that subcutaneous or intraperitoneal injections of these polymers can be used in clinical situations.

Keywords: Wistar rats, Bacterial cellulose, Histomorphometry, Kidney, Toxicity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Zoogleias amorfas ramificadas coletadas da superfície de filtros de gotejamento.....20

Figura 2. Aspecto morfológico da membrana de biopolímero produzido por via microbiológica, através da bactéria *Zoogloea* sp. em mosto de melação de cana-de-açúcar com diferentes dimensões.....21

Figura 3. A. Película de poliuretano moldada ao eixo peniano. **B.** Película de biopolímero de cana-de-açúcar moldada ao eixo peniano.....26

Figura 4. Úlcera varicosa, após 120 dias. Tecido de granulação presente, mais em A do que em B (seta verde), tecido epitelial mais leve do que tecido circundante (ou seja, cor rosa) (círculo preto) e bordas epitelizadas (seta preta).....27

Figura 5. Lesão por pressão (LP). Localização Sacral, presença de tecido fibrinoso desvitalizado (seta preta), melhora no tecido de granulação (seta amarela).....28

CAPÍTULO II

Figura 1. Diagrama ilustrativo do desenho do estudo.....41

Figura 2. Ausência de efeitos de uma única injeção subcutânea (n = 9M, 9F) ou intraperitoneal (n = 9M, 9F) de hidrogel de CB (200 mg/Kg pc) em biomarcadores séricos de toxicidade hepática, medidos 20 dias após o tratamento. As alturas das barras do histograma representam alterações nas dobras (média ± DP) das atividades de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina (ALP) no soro sanguíneo. Os ratos de controle (n = 6M, 6F) receberam uma injeção IP de solução de NaCl a 0,9% (4 mL/Kg pc). Atividade média do grupo controle = 1. As diferenças não foram significativas (ANOVA p > 0,05). Ratos M = machos; F = fêmeas.....46

Figura 3. Fotomicrografias de seções do tecido renal (dia 20 após o tratamento) de ratos tratados com uma única injeção subcutânea ou intraperitoneal de CB (200 mg/Kg pc) em D1. **A e B** – Não foram notadas alterações histológicas toxicologicamente significativas. Coloração HE.....48

Figura 4. Fotomicrografia da pele no 20º dia pós-implantação de CB em ratos. **A** - Implante CB (asterisco) imediatamente abaixo da camada da derme (seta longa). **B** - Neovascularização (setas curtas) e fibroblastos (pontas de setas). Coloração Picrosirius.....50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição de monossacarídeos encontrados no gel de biopolímero de cana-de-açúcar.....	22
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Efeitos de injeção única de hidrogel de CB (200 mg/Kg de peso corporal) sob a pele (CB-SC) ou na cavidade peritoneal (CB-IP) no ganho de peso corporal e no órgão (fígado, rins, baço) no dia 20 pós-tratamento. Os ratos do grupo controle receberam uma injeção intraperitoneal de solução de NaCl a 0,9% (IP salino, 4 mL/Kg de peso corporal) no 1º dia de tratamento.....	47
---	----

Tabela 2. Análise morfométrica dos corpúsculos renais de ratos controle (solução de NaCl a 0,9%, IP salino, 4 mL/Kg pc/ip) e de ratos injetados com hidrogel CB (200 mg/Kg pc) sob a pele (CB-SC) ou na cavidade peritoneal (CB-IP). Os rins foram removidos 20 dias após o tratamento e as seções de tecido foram coradas com HE..	49
--	----

Tabela 3. Principais achados do exame histopatológico da pele no local da injeção CB-SC (200 mg/Kg pc) em 9 ratos fêmeas e 9 machos.....	52
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP – Fosfatase Alcalina

ALT – Alanina Aminotransferase

ANOVA – Análise de Variância

AST – Aspartato Aminotransferase

CB – Celulose Bacteriana

GMN – Células Multinucleares Gigantes

IP – Intraperitoneal

LDH – Lactato desidrogenase

LP – Lesões por Pressão

ORC – Celulose Regenerada Oxidada

PC – Peso corporal

PTFE – Politetrafluoretileno

RMN-1H – Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear

SC – Subcutâneo

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Celulose bacteriana (CB)	17
2.2. Produção de biomateriais de celulose bacteriana de diversas marcas.....	18
2.3. <i>Zoogloea</i> sp.	19
2.4. Produção e caracterização da CB de <i>Zoogloea</i> sp. cultivadas em melão de cana-de-açúcar	21
2.5. Testes de biocompatibilidade	22
2.6. Estudos da CB de cana-de-açúcar em animais.....	23
2.7. Eficácia do CB de Cana-de-açúcar em humanos	26
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Geral	30
3.2. Específicos.....	30
4. REFERÊNCIAS.....	31

CAPÍTULO II

Toxicidade local e sistêmica (fígado e rins) da celulose bacteriana da cana-de-açúcar em ratos Wistar	36
1. Introdução	38
2. Material e métodos.....	39
3. Resultados	44
4. Discussão	52
5. Conclusões	55
Referências.....	56

ANEXOS

Instruções para Autores	Error! Bookmark not defined.
-------------------------------	-------------------------------------

1. INTRODUÇÃO

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o polímero orgânico, formado por uma cadeia linear não ramificada de moléculas de glicose unidas por ligação do tipo β -1,4-glicosídicas. Sendo encontrada na parede celular das plantas e produzida por organismos como fungos, algas e algumas bactérias (BROWN; SAXENA; KUDLICKA, 1996; KRAMER et al., 2006). É uma das macromoléculas orgânicas mais abundantes da Terra, sendo ótimo reservatório no ciclo do carbono e, em plantas mais altas, sua biogênese é um evento integral em crescimento e desenvolvimento celular (ROSS et al. 1991).

A celulose formada a partir de bactérias são denominadas de celulose bacteriana (CB), que tem várias vantagens sobre a celulose derivada de plantas, incluindo alta pureza (livre de lignina, hemicelulose e pectina), além de alta cristalinidade (podendo chegar até 90%) e elasticidade, biocompatibilidade, baixa densidade, alto grau de polimerização, excelente permeabilidade, alta porosidade e teor de água (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; REINIATI; HRYMAK; MARGARITIS, 2017). Ademais, a CB tem despertado interesse, visto que produz redes tridimensionais de fibras com diâmetros de aproximadamente 30-50nm, bem mais delgada que a celulose vegetal (REINIATI et al., 2017)

Os materiais com propriedades funcionais constituem uma área de pesquisa extremamente ativa e inovadora, na qual todos os aspectos da ciência dos materiais estão envolvidos, incluindo química, física, engenharia, biologia e nanotecnologia. Diferentes apresentações de materiais funcionais foram desenvolvidas para os mais variados fins, como monitoramento ambiental, indústria de alimentos, fabricação de baterias de íons e terapia clínica (YAO et al., 2018; ABBASI-MOAYED; GOLMOHAMMADI; HORMOZI-NEZHAD, 2018; WANG et al., 2018; PHIRI et al., 2018).

Destes, materiais funcionais à base de celulose bacteriana (biomateriais) têm atraído cada vez mais atenção devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas, além de alta segurança, baixo custo, alta flexibilidade e adaptabilidade, hidrofiliabilidade, transparência, excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (CAMPANO et al., 2016). Diversas pesquisas descrevem a versatilidade da CB na fabricação de nanocompostos fortes e biorrenováveis, bem como o rápido

crescimento de materiais biocompatíveis para utilização na área biomédica e em sistemas de administração de medicamentos (REINIATI et al. 2017).

Uma celulose bacteriana produzida pela Polímero para a Saúde (POLISA – LTDA), utiliza a bactéria *Zoogloea* sp. sobre um meio de cultura consistindo de melaço de cana-de-açúcar, responsável por produzir na interface ar-líquido um material semelhante a um gel (PATERSON-BEEDLE et al., 2000).

Testes iniciais do gel foram realizados *in vitro* por meio de índice de adesão, produção de óxido nítrico e viabilidade celular de macrófagos alveolares de ratos e os resultados foram satisfatórios, não apresentando respostas tóxicas para as células (CASTRO et al., 2004).

Também foram avaliados em ratos Wistar a toxicidade aguda, a citotoxicidade, a genotoxicidade e os efeitos antigenotóxicos da CB *in vitro* e *in vivo*, que indicaram que na faixa de dose testada a celulose não foi citotóxica e ainda atenuou os efeitos genotóxicos e mielotóxicos (PINTO et al., 2016).

Em estudos experimentais clínicos, a CB foi desenvolvida para seu uso como substituto vascular em arterioplastia femoral bilateral em cães, utilizando as membranas de biopolímero de cana-de-açúcar como remendo, agente de preenchimento anorretal para incontinência fecal, auxílio no processo cicatricial de lesões por pressão, como diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica, reparo de perfuração de membrana timpânica e curativos no tratamento de úlceras decorrentes de doenças venosas crônicas dos membros inferiores (MARQUES et al., 2007; SILVEIRA et al., 2016a; CAVALCANTI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019).

Embora alguns testes já tenham sido realizados, novos estudos adicionais de segurança não clínico são necessários antes de realizar uma decisão de iniciar os ensaios clínicos em longa escala e solicitar a aprovação de marketing dos produtos da CB para ampla comercialização. Contudo, não há estudos quanto à caracterização de toxicidade hepática e renal na composição química e bioquímica da molécula, sendo este, portanto, o objetivo deste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Celulose bacteriana (CB)

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o polímero orgânico mais abundante na natureza e forma a base estrutural da parede celular das plantas, sendo produzida também por outros organismos como fungos, algas e algumas bactérias não-patogênicas. É formada por uma cadeia linear não ramificada de moléculas de glicose unidas por ligação do tipo β -1,4-glicosídicas (ROSS; MAYER; BENZIMAN, 1991; BROWN; SAXENA; KUDLICKA, 1996; KRAMER et al., 2006; ABBASI-MOAYED; GOLMOHAMMADI; HORMOZI-NEZHAD, 2018).

Embora compartilhe a mesma fórmula molecular com a celuloses de plantas, CB é livre de lignina, hemicelulose e pectina, que estão normalmente presentes em celuloses derivados de plantas; assim, a purificação de CB é um processo fácil e menos dispendioso (HUNGUND, 2013). A celulose sintetizada por plantas necessita de processos de purificação complexos e caros, sendo a bacteriana mais simples. Mesmo possuindo a estrutura química da celulose vegetal, a CB é um biopolímero diferenciado, por apresentar fibras de caráter nanométrico, sendo o vegetal micrométrico. Além de apresentar maior pureza, cristalinidade, alto poder de absorção de água, baixo grau de polimerização e ser biocompatível (BROWN; SAXENA; KUDLICKA, 1996; DONINI et al., 2010).

Devido a esse diâmetro reduzido da fibra, a CB possui uma área superficial superior à celulose obtida de fontes vegetais e apresenta características mecânicas excepcionais, com um comportamento de tensão-deformação que se assemelha ao dos tecidos moles (GUO; CATCHMARK, 2012). A biossíntese da CB foi observada primeiramente em um antigo chá chinês, kombucha, uma bebida fermentada produzida por uma colônia simbiótica de bactérias do ácido acético e leveduras incorporadas a uma rede de celulose formado na superfície da bebida (MARSH et al., 2014).

Algumas explicações possíveis da formação de celulose por esses microrganismos são que a CB é formada como um mecanismo de autodefesa para proteger as bactérias dos efeitos nocivos da luz UV ou para ajudar as bactérias a

flutuarem na interface ar-líquido, a fim de garantir o suprimento suficiente de oxigênio (REINIATI; HRYMAK; MARGARITIS, 2017).

A CB consiste em um filme translúcido e gelatinoso, formado por microfibrilas de celulose entrelaçadas de comprimento indefinido, distribuídas em direções aleatórias. A CB é produzida extracelularmente pelas culturas bacterianas de *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Alcaligenes*, além da *Zoogloea* sp. (PATERSON-BEEDLE et al., 2000; PICHETH et al., 2017), que é objetivo do presente estudo.

O rendimento e as propriedades da CB dependem de vários fatores, incluindo a cepa bacteriana utilizada, a composição do meio de cultura e as condições operacionais aplicadas durante o processo de cultivo (AZEREDO et al., 2019). De acordo com o processo de fermentação e as condições empregadas, a CB pode ser moldado para qualquer forma, tamanho ou espessura e, portanto, pode ser precisamente adaptado para diversas aplicações (CHAWLA et al., 2009). A celulose bacteriana apresenta características importantes que combinam várias propriedades superficiais e macromoleculares, essenciais para aplicações *in vitro* e *in vivo* (PICHETH et al., 2017). Hoje em dia a CB é aplicada em cosméticos, indústria de alimentos e têxtil. Porém, a mesma ganha maior destaque na área biomédica com a criação de bioprodutos como na substituição de membrana timpânica e de dura-máter (DONINI et al., 2010; SILVEIRA et al., 2016a; LIMA et al., 2017a).

2.2. Produção de biomateriais de celulose bacteriana de diversas marcas

Muitos bioprodutos hoje são comercializados possuindo assim uma marca, apresentando diversas finalidades. Os produtos da BIOFILL[®], BIOPROCESS[®] e GENGIFLEX[®] são produtos de celulose microbiana (bacteriana) que por muito anos já são usados na aplicações em cirurgias e implantes dentários (JONAS; FARAH, 1998).

Um estudo descreve a formação de celulose bacteriana usando *Acetobacter xylinum*, criando um substituto vascular que foi patenteado como BASYC[®] e foi usado

nas veias jugulares de 10 ratos não mostraram complicações como rompimento da parede arterial, estenose ou trombose (KLEMM et al., 2001).

Relatórios recentes descrevem a capacidade da membrana do CB também produzida por *Acetobacter xylinum*, na reparação de defeitos da dura-máter em coelhos, evitam a adesão ao tecido cerebral e geram menor resposta inflamatória em comparação com os substituintes comerciais da dura-máter (XU et al., 2014).

A MEMBRACEL[®] é uma membrana de celulose cristalina sintetizada pela bactéria *Acetobacter xylinum*, usada como substituta temporária de pele, no tratamento para queimaduras, úlceras e lacerações promovendo regeneração rápida da pele (PICHETH et al., 2017).

BIONEXT[®] e XCELL[®], ambas sintetizadas a partir da bactéria *Acetobacter xylinum*, são utilizados como curativos para úlceras venosas, queimaduras e lacerações, tendo como efeitos os alívios da dor, infecção reduzida e cicatrização mais rápida (GORGIEVA; TRČEK, 2019).

Os biomateriais produzidos a partir da *Zoogloea* sp., sintetizadas da fermentação sobre o melaço da cana-de-açúcar é denominado POLYCELL[®], sendo usando por exemplo em tratamentos de lesão (úlceras) por pressão (OLIVEIRA et al., 2019).

2.3. *Zoogloea* sp.

As bactérias do gênero *Zoogloea*, gram-negativas, pertencem à família Pseudomonadaceae e apresentam células em forma de bastonetes arredondados, por vezes cônicas, com tamanho médio de 1,0 a 1,3 µm de diâmetro por 2,1 a 3,6 µm de comprimento. Esses microrganismos não formam esporos e suas células, em culturas envelhecidas, são encapsuladas e podem parecer alongadas. Já em culturas novas são móveis, e apresentam um único flagelo polar. Em meio que contenha sais orgânicos são formados grânulos intracelulares de hidroxibutirato. Além disso, um encadeamento de células do gênero *Zoogloea* é raro (UNZ et al., 1984; MELO, 2003).

De forma mais ampla, ambas as espécies, *Z. ramigera* e *Z. filipendula*, são encontradas principalmente em águas organicamente poluídas e em todos os estágios

de tratamento da água. Essas espécies foram isoladas de esgotos ou de sistemas de tratamento de esgotos que empregam métodos oxidativos, ou seja, sistemas de lodo ativado, filtros de gotejamento ou lagos de oxidação (UNZ et al., 1984, DUGAN, STONER & PICKRUM 1992, MELO 2003).

As culturas iniciam a formação de flocos e filmes no meio líquido, no estágio posterior à fase de crescimento exponencial e as células formam uma massa embebida em uma matriz gelatinosa denominada zoogleia (Figura 1), distinguida por uma morfologia típica em forma de árvore e dedos (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

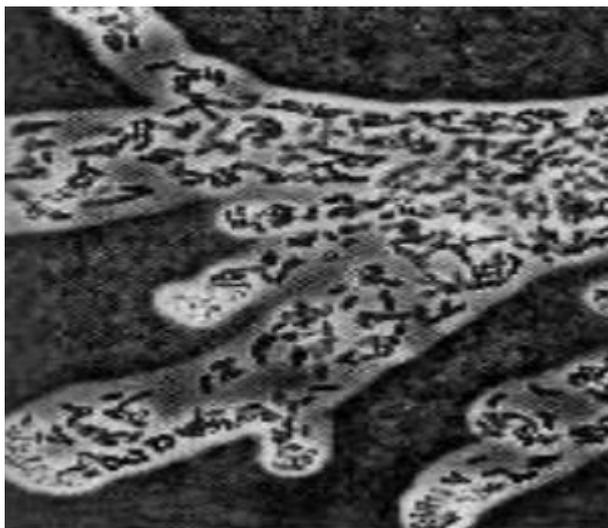


Figura 1. Zoogleias amorfas ramificadas coletadas da superfície de filtros de gotejamento (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996).

A preservação da *Zoogloea* pode ser realizada de forma indefinida por liofilização, uma vez que esta bactéria não sobrevive, contudo, a uma refrigeração prolongada (MELO 2003).

As colônias jovens da bactéria não são pigmentadas e em meio sólido sob circunstâncias atmosféricas normais são transparentes e puntiformes, podendo medir de 1 a 2 mm de diâmetro e exibir centros opacos. São aeróbicas, podendo apresentar, porém, crescimento anaeróbico em presença de nitrato, realizando o processo de desnitrificação que consiste na redução do nitrato a N_2 . Para o crescimento, a temperatura ideal é de 28 – 37°C, e o pH ótimo encontra-se entre 7,0 e 7,5. O teste de oxidase é positivo e o de catalase raramente positivo. Muitas cepas são urease positivas e quimiorganotróficas (UNZ et al., 1984).

2.4. Produção e caracterização da CB de *Zoogloea* sp. cultivadas em melão de cana-de-açúcar

A celulose bacteriana é produzida pela empresa Polímero Para Saúde (POLISA – LTDA), em parceria com a Estação Experimental da Cana-de-Açúcar da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECC-UFRPE), situadas na cidade de Carpina, PE, Brasil. A bactéria produtora do polissacarídeo é a *Zoogloea* sp., que é transferida para um meio esterilizado, consistindo de melão de cana-de-açúcar. As culturas são incubadas a 30 °C durante sete dias, formando na interface ar-líquido uma material semelhante a um gel (Figura 2) (NÉRIS, 2007; PATERSON-BEEDLE et al., 2000).

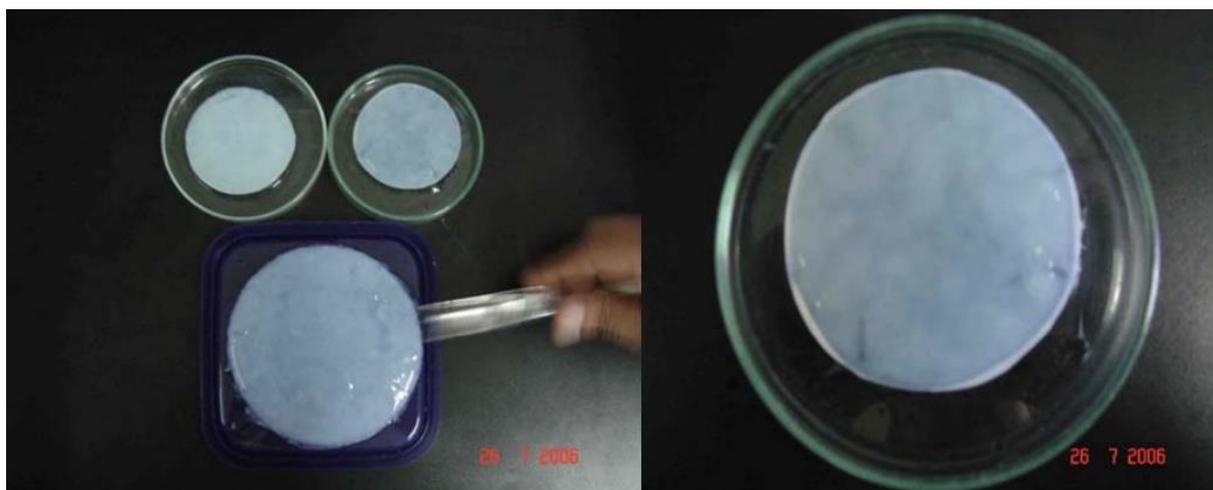


Figura 2. Aspecto morfológico da membrana de biopolímero produzido por via microbiológica, através da bactéria *Zoogloea* sp. em mosto de melão de cana-de-açúcar com diferentes dimensões (NÉRIS, 2007).

O gel (matriz) é constituído por monossacarídeos, sendo eles glicose (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4%) e o ácido glucurônico (0,8%) (Tabela 1) e através dele podem ser produzidos novos produtos utilizados na medicina como esponja, membranas e filmes (PATERSON-BEEDLE et al., 2000; CAVALCANTI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019).

Tabela 1. Composição de monossacarídeos encontrados no gel de biopolímero de cana-de-açúcar.

Monossacarídeos	Total (%)
Glicose	87,6
Xilose	8,6
Manose	0,8
Ribose	1,7
Galactose	0,1
Arabinose	0,4
Ácido glucurônico	0,8

2.5. Testes de biocompatibilidade

A celulose bacteriana é um produto de origem natural e possui uma estrutura química que consiste em açúcares polimerizados. Este biopolímero é estável, seguro e não é absorvido pelos tecidos circundantes (PITA et al., 2015; PINTO et al., 2016).

Testes de citotoxicidade e biocompatibilidade foram realizados para que os bioprodutos produzidos a partir da CB fossem aplicados em estágio experimental em animais e humanos. Os primeiros testes foram realizados *in vitro* por meio de índice de adesão, produção de óxido nítrico e viabilidade celular de macrófagos alveolares de ratos e os resultados foram satisfatórios, não apresentando resposta tóxicas para as células (CASTRO et al., 2004).

No estudo de Pita et al. (2015), cujo objetivo foi avaliar a permanência do implante de hidrogel de CB em locais que sofrem os efeitos da gravidade e da compressão exercida pela ação muscular, sendo esses os espaços subcutâneos da orelha, nas superfícies anterior e posterior da concha; do couro cabeludo, no perióstio; e na aponeurose muscular do terço médio dos lados externo e interno das coxas de coelhos, através de análise clínica e histológica, sugeriu sua

biocompatibilidade quando evidenciou integração ao tecido dos animais, indução a remodelação tecidual e ausência de sinais clínicos de toxicidade ou efeitos adversos, durante os 84 dias de experimento, a exemplo de inchaço, vermelhidão, infecção ou eliminação de material enxertado.

O fato de não ter havido migração, infecção ou extrusão do hidrogel nos sítios de implante demonstra sua baixa toxicidade e alta biocompatibilidade com os tecidos, bem como encoraja aprofundamento nas pesquisas utilizando o produto com finalidade biomaterial, como agente de volume para expansão tecidual. Visto que a composição química das propriedades físicas do hidrogel não induz a resposta imunológica, ele é considerado um material promissor, com amplo espectro de aplicações nas ciências biológicas (PITA et al. 2015).

Por fim, Pinto et al. (2016) realizaram estudos em ratos Wistar, avaliando quatro aspectos da CB *in vitro* e *in vivo*: toxicidade aguda, com 10 animais recebendo dose única de 2,000mg de CB 0,8%/Kg de peso corporal, pelo método de gavagem, e sendo observados para identificação de mudanças de comportamento ou aparecimento de sinais clínicos de toxicidade a cada 30 minutos durante as primeiras quatro horas após o tratamento, e depois uma vez ao dia por 14 dias consecutivos; citotoxicidade, avaliada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura quando houvesse ruptura de membrana celular das células C3A, após serem tratadas com soluções de CB em concentrações que variaram de 0,33 µg/mL até 170 µg/mL; genotoxicidade, com 60 animais divididos em grupos (um controle com veículo água; um controle positivo com ciclofosfamida aplicado por via intraperitoneal em dose única de 25 mg/Kg de peso corporal; dois grupos tratados com doses diárias de até 200mg de CB 0,8%/Kg de peso corporal durante três dias consecutivos, um através da gavagem, e o outro por injeção intraperitoneal); e os efeitos antígenotóxicos, que concluíram que, na faixa de doses testadas, a celulose não foi citotóxica e ainda atenuou os efeitos genotóxicos e mielotóxicos.

2.6. Estudos da CB de cana-de-açúcar em animais

Nas primeiras pesquisas em cães, foram comparados o uso da membrana de CB com próteses sintéticas utilizadas como remendo nas arterioplastias. Após os 180

dias de experimento, insinuou-se que a membrana do biopolímero de cana-de-açúcar constitui-se em um substituto arterial adequado (MARQUES et al., 2007).

Avaliando histologicamente o processo de integração do gel da celulose produzida pela *Zoogloea* sp. implantado em olhos eviscerados em um estudo experimental utilizando 36 olhos de 18 coelhos, mostrou que o hidrogel de CB é biocompatível e foi integrado às órbitas (CORDEIRO-BARBOSA et al., 2012).

Caracterização da deposição de fibras colágenas e potencial litogênico na bexiga de ratos submetidos a enxerto da CB de cana-de-açúcar, conferiu que a este é um material com integração adequada em bexigas. Sendo sua absorção mais lenta que a poliglactina e está associada à menor presença de cálculos após o enxerto, havendo maior resposta do tecido inflamatório (CARVALHO JUNIOR et al., 2012).

Com o objetivo de avaliar hidrogel de CB do melaço de cana-de-açúcar como transportador de proteína morfogenética óssea na reconstrução de defeitos ósseos críticos em ratos, Medeiros-Júnior et al. (2013) conclui que há maior formação de tecido ósseo, com resultados estatisticamente significantes nos grupos que associaram gel e membrana de biopolímeros mostrando-se um excelente transportador de proteínas morfogenéticas ósseas, provavelmente facilitando a liberação controlada dessas proteínas no processo de reparo ósseo.

Na sua apresentação de filme esponjoso a membrana celulósica foi utilizada como curativo para tratamento de estomatite aftosa em coelhos, foi eficaz como barreira mecânica e pode ser utilizado como auxiliar no tratamento sintomático e na cicatrização das lesões ulcerativas da mucosa oral, associadas ao seu baixo custo, compatibilidade e facilidade de tratamento (TEIXEIRA et al., 2014).

Já Albuquerque et al. (2015) afirmaram a partir do exame macroscópico no tecido osteocondral de coelhos, reparado com a celulose bacteriana de cana-de-açúcar, a superfície articular apresentou cicatrização, coloração, consistência e continuidade semelhantes ao tecido formado em defeitos osteocondrais curados naturalmente no grupo controle.

Objetivando analisar a eficácia do hidrogel de celulose bacteriana como barreira mecânica para reduzir reações inflamatórias, fibrose e formação de adesão nas estruturas intra-abdominais e comparando seus resultados com o uso de uma barreira de celulose regenerada oxidada (ORC) e usando um grupo salino, foi definido que o hidrogel de celulose bacteriana é eficaz como barreira bio-reabsorvível e é

capaz de impedir aderências peritoneais pós-operatórias (COELHO JUNIOR et al., 2015).

Com estudos de defeitos críticos na calota craniana em ratos Wistar, Abreu et al. (2016) concluíram que houve cura no período pós-operatório sem intercorrências para todos os animais do estudo. Além disso, sugeriu que a CB granulada parece oferecer a mesma biocompatibilidade apresentada em estudos anteriores, uma vez que não foram encontradas complicações (reações inflamatórias ou alérgicas).

Uma pesquisa com objetivo de usar malhas fabricadas a partir de celulose bacteriana e avaliar sua interação com os tecidos orgânicos e comparar com uma prótese expandida de politetrafluoretileno (PTFE) usada para reparar defeitos agudos do aponeurótico muscular induzido em ratos, Silveira et al. (2016b) concluíram que houve integração biológica e elasticidade biomecânica da CB; achando que essa opção deve ser considerada como um novo biomaterial alternativo para uso como uma prótese biológica.

Em um estudo translacional, Maia et al. (2018) utilizaram a CB para reforçar a anastomose uretrovesical em coelhos concluindo que a ausência de extrusão, estenose ou fístula urinária após 14 semanas de anastomose uretrovesical demonstra biocompatibilidade e biointegração da membrana exopolissacarídica celulósica com tendência a uma parede mais espessa.

Outro estudo, também no sistema urinário, porém de ratas, trata de um experimento, com a utilização de silicone, onde a CB induziu o aparecimento fibroblastos na área de implante, mantendo o equilíbrio com a intensa deposição de colágeno, sem tendência à encapsulação. Já no grupo que recebeu apenas CB, a vasculogênese foi significativa. Ao mesmo tempo, a quantidade de colágeno foi moderada, com presença de fibras colágenas maduras, além de incontáveis infiltrados de fibroblastos em volta da celulose residual. Assim, a análise das diferentes fases de incorporação da CB ao tecido evidenciou, além do alto nível de integração, espessamento da parede uretral, promovendo o remodelamento e o fortalecimento do tecido com base nos resultados morfométricos e histológicos. Esta pesquisa busca prevenir danos uretrais e, pela CB ser um produto natural, obtido de fontes renováveis de baixo custo, pode ser considerado como material para futuro uso na área da urologia (LIMA et al., 2017b).

Recentemente, com o propósito de avaliar os efeitos do hidrogel de celulose bacteriana nas pressões de repouso anorretais em ratos submetidos à lesão de esfíncter anal, 39 animais foram analisados após setenta dias e os dados sugeriram que o hidrogel pode ser usado futuramente como agente de preenchimento para incontinência fecal em ensaios clínicos (CAVALCANTE et al., 2018).

2.7. Eficácia do CB de Cana-de-açúcar em humanos

Após sua eficácia mostrada em animais, estudos em humanos começaram a ser realizados com as diversas apresentações da celulose bacteriana, filmes, membranas e gel. Um estudo utilizando a membrana de CB em cirurgias de hipospádias, afirma que é uma alternativa promissora para o tratamento de crianças e adolescentes submetidos à cirurgia genital (Figura 3). Sendo sua principal vantagem a possibilidade de várias lavagens ao longo do dia sem a necessidade de qualquer outra manipulação (MARTINS et al., 2013).

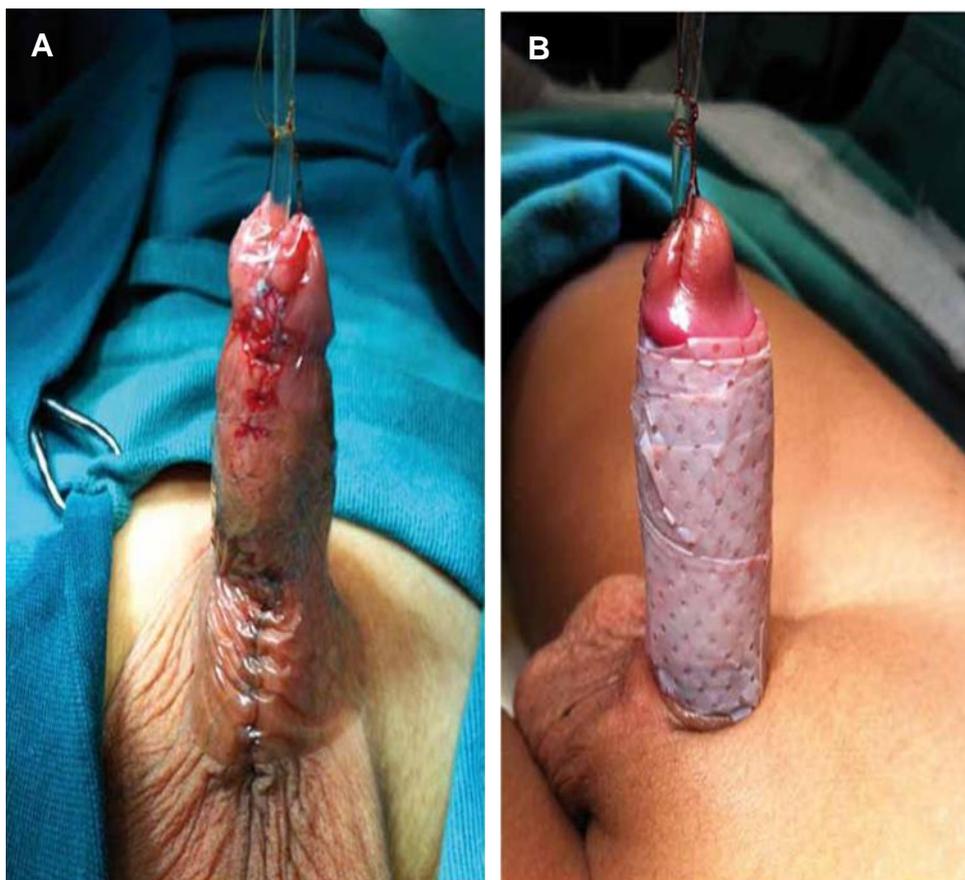


Figura 3. A. Película de poliuretano moldada ao eixo peniano. **B.** Película de biopolímero de cana-de-açúcar moldada ao eixo peniano (MARTINS et al., 2013).

Em um estudo randomizado utilizando a CB como Tratamento da perfuração da membrana timpânica, mostrou que seu uso como enxerto promoveu a regeneração do tímpano, mostrando-se uma opção inovadora, segura, eficaz e minimamente invasiva (SILVEIRA et al., 2016a).

Algumas pesquisas com a CB se concentram no seu efeito cicatrizante em feridas cutâneas. A membrana de CB foi usada como curativo para o tratamento de úlceras varicosas dos membros inferiores, permitindo observar que a membrana de celulose bacteriana possui as propriedades ideais como curativo, para manter a umidade no leito da ferida, absorver o excesso de exsudatos, limitar processos infecciosos e proteger a lesão contra trauma mecânico (CAVALCANTI et al., 2017) (Figura 4).

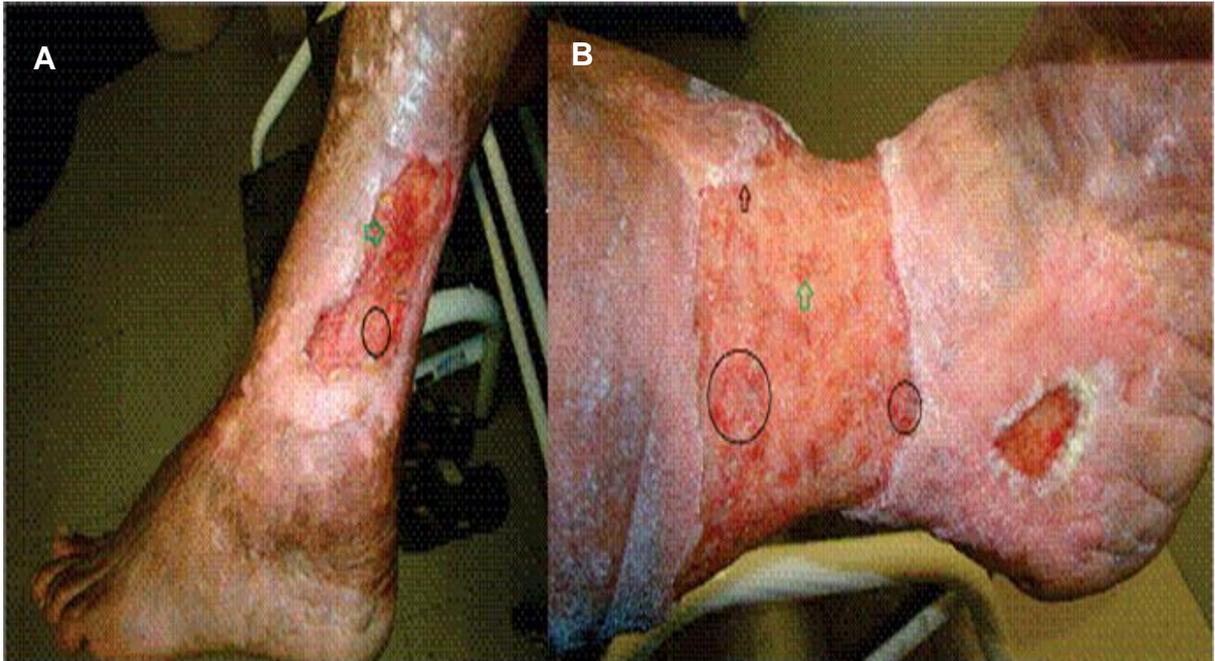


Figura 4. Úlcera varicosa, após 120 dias. Tecido de granulação presente, mais em A do que em B (seta verde), tecido epitelial mais leve do que tecido circundante (ou seja, cor rosa) (círculo preto) e bordas epitelizadas (seta preta) (CAVALCANTI et al., 2017).

Estudos atuais com proposta de monitorar a evolução do processo cicatricial das lesões por pressão (LP) (Figura 5) em pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), a partir da aplicação da cobertura de CB, relata que a esta funciona como barreira física e é indutor do remodelamento tecidual (OLIVEIRA et al., 2019).



Figura 5. Lesão por pressão (LP). Localização Sacral, presença de tecido fibrinoso desvitalizado (seta preta), melhora no tecido de granulação (seta amarela) (OLIVEIRA et al., 2019).

Pesquisa estudam usar futuramente em humanos, uma unha que foi produzida a partir da celulose bacteriana que tem propriedades viscoelásticas e é estável em concentrações a 0,6% e 0,8%, esperando manter o formato, auxiliar a recuperação e evitar a aderências entre a cutícula e o leito ungueal (PINTO; OLIVEIRA, 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Analisar a presença de efeitos adversos locais e sistêmicos, sendo eles vermelhidão, inchaço, infecção e eliminação de material enxertado, do hidrogel de celulose bacteriana a 0,8%, sintetizada a partir da bactéria *Zoogloea* sp. sobre um meio de cultura consistido em melaço de cana-de-açúcar, após o implante sob a pele (administração subcutânea) ou injeção na cavidade peritoneal de ratos Wistar.

3.2. Específicos

- Avaliar os efeitos toxicológicos através dos sinais clínicos de toxicidade;
- Avaliar as atividades de biomarcadores de lesão hepática no soro sanguíneo;
- Analisar através da histomorfometria os efeitos locais na pele e sistêmico no rim;
- Analisar quimicamente por espectroscopia e análise elementar a celulose bacteriana.

4. REFERÊNCIAS

- ABBASI-MOAYED, S.; GOLMOHAMMADI, H.; HORMOZI-NEZHAD, M. R. A nanopaper-based artificial tongue: a ratiometric fluorescent sensor array on bacterial nanocellulose for chemical discrimination applications. **Nanoscale**, v. 10, n. 5, p. 2492–2502, 2018.
- ABREU, T. C. et al. The biopolymer sugarcane as filling material of critical defects in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 53–58, 2016.
- ALBUQUERQUE, P. C. V. C. et al. A comparative study of the areas of osteochondral defects produced in femoral condyles of rabbits treated with sugar cane biopolymer gel. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 770–777, 2015.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, 2019.
- BROWN, R. M.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 5, p. 149–156, 1996.
- CAMPANO, C. et al. Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 57–91, 2016.
- CARVALHO JUNIOR, A. M. et al. Characterization of the deposition of collagen fibers and Lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 38, n. 4, p. 544–551, 2012.
- CASTRO, C. M. M. B. et al. Citotoxicidade de biopolímero de cana-de-açúcar. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 49, n. 2, p. 119–123, 2004.
- CAVALCANTE, A. R. T. et al. Effects of bacterial cellulose gel on the anorectal resting pressures in rats submitted to anal sphincter injury. **Heliyon**, v. 4, n. 12, p. e01058, 2018.
- CAVALCANTI, L. M. et al. Efficacy of bacterial cellulose membrane for the treatment of lower limbs chronic varicose ulcers: a randomized and controlled trial. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 44, n. 1, p. 72–80, 2017.
- CHAWLA, P. R. et al. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.
- COELHO JUNIOR, E. R. et al. Prevention of peritoneal adhesion using a bacterial cellulose hydrogel, in experimental study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 194–198, 2015.
- CORDEIRO-BARBOSA, F. A. et al. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 75, n. 4, p. 267–272, 2012.

DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165–178, 2010.

DUGAN, P. R.; STONER, D. L.; PICKRUM, H. M. The genus Zoogloea. In: BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. (eds). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlag, 1992. p. 3952-3964.

GORGIEVA, S.; TRČEK, J. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. **Nanomaterials**, v. 9, n. 10, p. 1352, 2019.

GUO, J.; CATCHMARK, J. M. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1026–1037, 2012.

HUNGUND, B. Production of Bacterial Cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2 using Dual and Cheaper Carbon Sources. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 5, n. 2, 2013.

JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, Biodegradable Polymers and Macromolecules. v. 59, n. 1, p. 101–106, 1998.

KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561–1603, 2001.

KRAMER, F. et al. Nanocellulose Polymer Composites as Innovative Pool for (Bio)Material Development. **Macromolecular Symposia**, v. 244, n. 1, p. 136–148, 2006.

LIMA, F. M. T. et al. Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural defect repair of rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 3, p. 37, 2017a.

LIMA, S. V. C. et al. A new material to prevent urethral damage after implantation of artificial devices: an experimental study. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 43, n. 2, p. 335–344, 2017b.

MAIA, G. T. S. et al. Bacterial cellulose to reinforce urethrovesical anastomosis. A translational study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 673–683, 2018.

MARQUES, S. R. B. et al. Um novo substituto vascular: arterioplastia femoral em cães com remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar - avaliação hemodinâmica e histopatológica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 6, n. 4, p. 309–315, 2007.

MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food Microbiology**, v. 38, p. 171–178, 2014.

MARTINS, A. G. S. et al. A wet dressing for hypospadias surgery. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 39, n. 3, p. 408–413, 2013.

MEDEIROS JÚNIOR, M. D. et al. Hydrogel of polysaccharide of sugarcane molasses as carrier of bone morphogenetic protein in the reconstruction of critical bone defects in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 233–238, 2013.

MELO, F. A. D. **Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogloea* sp. em melaço de cana-de-açúcar**. 2003. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/6828/1/arquivo8009_1.pdf>. Acesso em: 6 jan. 2020.

NÉRIS, M. A. Desenvolvimento e caracterização de gel de biopolímero produzido pela fermentação de melaço da cana-de-açúcar pelo microorganismo *Zoogloea* sp. contendo ácido úsnico. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/3586/1/arquivo6388_1.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2020.

OLIVEIRA, G. M. et al. Curativo de celulose bacteriana para o tratamento de lesões por pressão em pacientes hospitalizados. **Revista Enfermagem Atual InDerme**, v. 87, n. Especial, 2019.

PATERSON-BEEDLE, M. et al. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 4, p. 375–383, 2000.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: Conceitos e aplicações. 2. ed. v. 2. São Paulo: Makron Books, 1996. p. 359-363.

PHIRI, J. et al. Co-exfoliation and fabrication of graphene based microfibrillated cellulose composites – mechanical and thermal stability and functional conductive properties. **Nanoscale**, v. 10, n. 20, p. 9569–9582, 2018.

PICHETH, G. F. et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017.

PINTO, F. C. M. et al. Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 556–560, 2016.

PINTO, F. C. M.; OLIVEIRA, M. Unha cirúrgica de biopolímero de cana de açúcar para preservação do leito ungueal após avulsão. **Revista Enfermagem Atual InDerme**, v. 87, n. 25, 2019.

PITA, P. C. C. et al. Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 296–300, 2015.

REINIATI, I.; HRYMAK, A. N.; MARGARITIS, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 510–524, 2017.

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 1, p. 35–58, 1991.

SILVEIRA, F. C. A. et al. Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 82, n. 2, p. 203–208, 2016a.

SILVEIRA, R. K. et al. Bioprosthetic mesh of bacterial cellulose for treatment of abdominal muscle aponeurotic defect in rat model. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 8, p. 129, 2016b.

TEIXEIRA, F. M. F. et al. Spongy film of cellulosic polysaccharide as a dressing for aphthous stomatitis treatment in rabbits. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 4, p. 231–236, 2014.

UNZ, R. F. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. v. 1. Londres: Williams & Wilkins, 1984. p. 199-210.

WANG, B. et al. Embedded binary functional materials/cellulose-based paper as freestanding anode for lithium ion batteries. **Electrochimica Acta**, v. 260, p. 1–10, 2018.

XU, C. et al. Bacterial Cellulose Membranes Used as Artificial Substitutes for Dural Defection in Rabbits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10855–10867, 2014.

YAO, J. et al. Color-tunable luminescent macrofibers based on CdTe QDs-loaded bacterial cellulose nanofibers for pH and glucose sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 254, p. 110–119, 2018.

Toxicidade local e sistêmica (fígado e rins) da celulose bacteriana da cana-de-açúcar em ratos Wistar

Jaiurte Gomes Martins da Silva¹, Flávia Cristina Morone Pinto², Olávio Campos Júnior³, Glícia Maria de Oliveira², Anderson Arnaldo da Silva³, Rosângela R. de Carvalho⁴, Ana Cecília AX de Oliveira⁴, Thamyris Perez de Souza⁴, Francisco José R. Paumgartten⁴, Valeria Wanderley-Teixeira¹, Álvaro AC Teixeira¹, José Lamartine A. Aguiar²

¹Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Pernambuco, Brasil;

²Centro de Cirurgia Experimental, Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Pernambuco, Brasil;

³Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Pernambuco, Brasil;

⁴Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

* **Autor Correspondente:** Flavia Cristina Morone Pinto, PhD. Centro de Cirurgia Experimental, Departamento de Cirurgia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Pernambuco, Brasil. Endereço de e-mail: fcmorone@gmail.com

RESUMO

Um hidrogel de celulose bacteriana a 0,8%, biopolímero produzido a partir do melaço de cana-de-açúcar e sintetizado a partir de bactéria *Zoogloea* sp., foi analisado quanto à sua composição e testado por duas vias de administração, subcutânea e intraperitoneal, para esclarecer os efeitos adversos locais e sistêmicos após implante na pele de ratos Wistar (24 machos, 24 fêmeas, 55 dias de idade). A análise de duas amostras (S1 e S2) de filmes CB indica carbono (S1, 42,94%; S2, 43,43%), hidrogênio (S1, 6,73%; S2, 6,76%), nitrogênio (S1, 0,28%, S2, 0,23%) e oxigênio (S1, 50,05%, S2, 49,58%). Nenhum comportamento anormal, sinais clínicos de toxicidade crônica ou inflamação foram observados. Não houve alteração nos níveis de biomarcadores de lesão hepática (ALT, AST e ALP), na histologia renal, onde se fez avaliação a procura de sinais de lesão celular tubular, dano glomerular ou vascular, nem na morfometria renal, onde foram quantificados os corpúsculos renais e a área do espaço capsular. Assim, a ausência de sinais e sintomas de toxicidade sugere que injeções subcutâneas ou intraperitoneais desses polímeros possam ser utilizadas em situações clínicas.

Palavras-chave: Ratos Wistar; celulose bacteriana; rim; fígado; pele; toxicidade; citotoxicidade; exopolissacarídeo; toxicidade local.

ABSTRACT

A hydrogel of bacterial cellulose of 0.8%, biopolymer produced from sugarcane molasses and synthesized from a bacteria called *Zoogloea* sp., was analyzed for its composition and tested by two routes of administration, subcutaneous and intraperitoneal, to clarify the local and systemic adverse effects after skin implantation in Wistar rats (24 males, 24 females, 55 days old). Analysis of two samples (S1 and S2) of BC films indicates carbon (S1, 42.94%; S2, 43.43%), hydrogen (S1, 6.73%; S2, 6.76%), nitrogen (S1, 0.28%, S2, 0.23%) and oxygen (S1, 50.05%, S2, 49.58%). No abnormal behavior, clinical signs of chronic toxicity or inflammation were observed. There was no change in liver injury biomarker levels (ALT, AST and ALP), as well as in renal histology, where it was evaluated to signs of tubular cell injury, glomerular or vascular damage, and renal morphometry, in which it was quantified the number of renal corpuscles, the number of cells per glomerulus and the capsular space area. Thus, the absence of signs and symptoms of toxicity suggests that subcutaneous or intraperitoneal injections of these polymers may be used in clinical situations.

Keywords: Wistar rats; bacterial cellulose; kidney; liver; skin; toxicity; cytotoxicity; exopolysaccharide; local toxicity.

1. Introdução

Polissacarídeos sintetizados por bactérias têm propriedades adequadas para aplicações biomédicas (alto grau de pureza, biodegradabilidade, elasticidade e flexibilidade) (Fragoso et al., 2014; Silveira et al., 2016; Gonçalves-Pimentel et al., 2018).

A biocompatibilidade e a falta de citotoxicidade desse biopolímero em testes preliminares, aliadas aos seus custos de produção relativamente baixos, levaram a pesquisas sobre as possíveis aplicações médicas desse novo e promissor biomaterial (Lucena et al., 2015; Pinto et al., 2016; Donini et al., 2018).

Estudos experimentais e clínicos sugeriram que o hidrogel de celulose bacteriana (CB) da cana-de-açúcar é um biomaterial útil para uma variedade de procedimentos cirúrgicos, como correção de hipospádias, dentre outros usos na cirurgia urológica (Martins et al., 2013; Lima et al., 2015; Lucena et al., 2015), tratamento de incontinência fecal após trauma anal (Cavalcante et al., 2018), tratamento de olhos eviscerados (Cordeiro-Barbosa et al., 2012), reparo da perfuração da membrana timpânica (Silveira et

al., 2016), procedimentos de cirurgia vascular (Barros-Marques et al., 2012), cirurgia ortopédica (Albuquerque et al., 2011) e neurocirurgia (Lima et al., 2017).

Embora estudos preliminares indiquem que a CB apresenta uma baixa toxicidade aguda e não tem efeitos genotóxicos e citotóxicos (Castro et al., 2004; Pinto et al., 2016), são necessários estudos adicionais de segurança não-clínica antes de realizar uma decisão de iniciar os ensaios clínicos e solicitar a aprovação de marketing dos produtos da CB.

Assim, neste estudo, o biopolímero testado foi o exopolissacarídeo de celulose bacteriana produzido a partir do melaço da cana-de-açúcar, sintetizado da bactéria *Zoogloea* sp. Para isso, um estudo de segurança não-clínica foi realizado para lançar luz sobre os efeitos adversos locais e sistêmicos do hidrogel de celulose bacteriana a 0,8% após a implantação sob a pele (administração subcutânea) ou injeção na cavidade peritoneal de ratos Wistar.

2. Material e métodos

2.1. A celulose bacteriana

O hidrogel de celulose bacteriana (CB) a 0,8% foi produzido por fermentação bacteriana do melaço de cana-de-açúcar. O hidrogel foi fabricado pela *POLISA Biopolímeros para a Saúde*, localizada na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECC/UFRPE). Seringas hipodérmicas descartáveis contendo o hidrogel de CB a 0,8% pronto para uso foram fornecidas como unidades únicas embaladas e seladas com fita de papel cirúrgica, esterilizada por irradiação gama de 25kGy no Laboratório de Metrologia do Departamento de Energia Nuclear da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Também foram produzidas duas amostras (S1 e S2) de filmes de CB.

2.2. Animais

Ratos Wistar (24 machos, 24 fêmeas, 55 dias de idade) do criadouro da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) foram utilizados no experimento. Na chegada às instalações do laboratório, os ratos foram alojados em gaiolas plásticas padrão com tampas de cobertura de aço inoxidável e forradas com maravalha, e mantidos em condições ambientais controladas ($22 \pm 0,5$ °C, fotoperíodo de 12 horas com luzes acesas das 8:00 às 20:00; 55-70% de umidade relativa do ar e alterações controladas da ventilação ambiente). Uma dieta comercial peletizada para roedores de laboratório (Labina[®], Purina[®]) e água da torneira filtrada foram disponibilizadas *ad libitum* durante todo o experimento.

Os ratos foram tratados de acordo com a legislação de Bem-Estar e Proteção Animal Brasileira, e internacional *Guide for Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition, 2011, of the US National Institutes of Health* (Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, 8^a edição, 2011, dos Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos), além das diretrizes nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório para pesquisa científica. O projeto de pesquisa foi aprovado (Licença LW-3/15) pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ).

2.3. Desenho do estudo

Os ratos foram alocados aleatoriamente em três grupos experimentais mostrados na Fig.1. No experimento dia 1 (D1), um grupo de ratos (9♀ e 9♂) recebeu uma única injeção subcutânea de CB (200 mg/Kg de peso corporal (pc), 4 mL/Kg/PC), enquanto para um segundo grupo (9♀ e 9♂) foi administrada dose única de CB (200 mg/Kg pc, 4 mL/Kg pc) pela via intraperitoneal (IP). Um terceiro grupo (controle) (6♀ e 6♂) foi tratado com uma única injeção intraperitoneal de solução de NaCl a 0,9% (4 mL/kg pc).

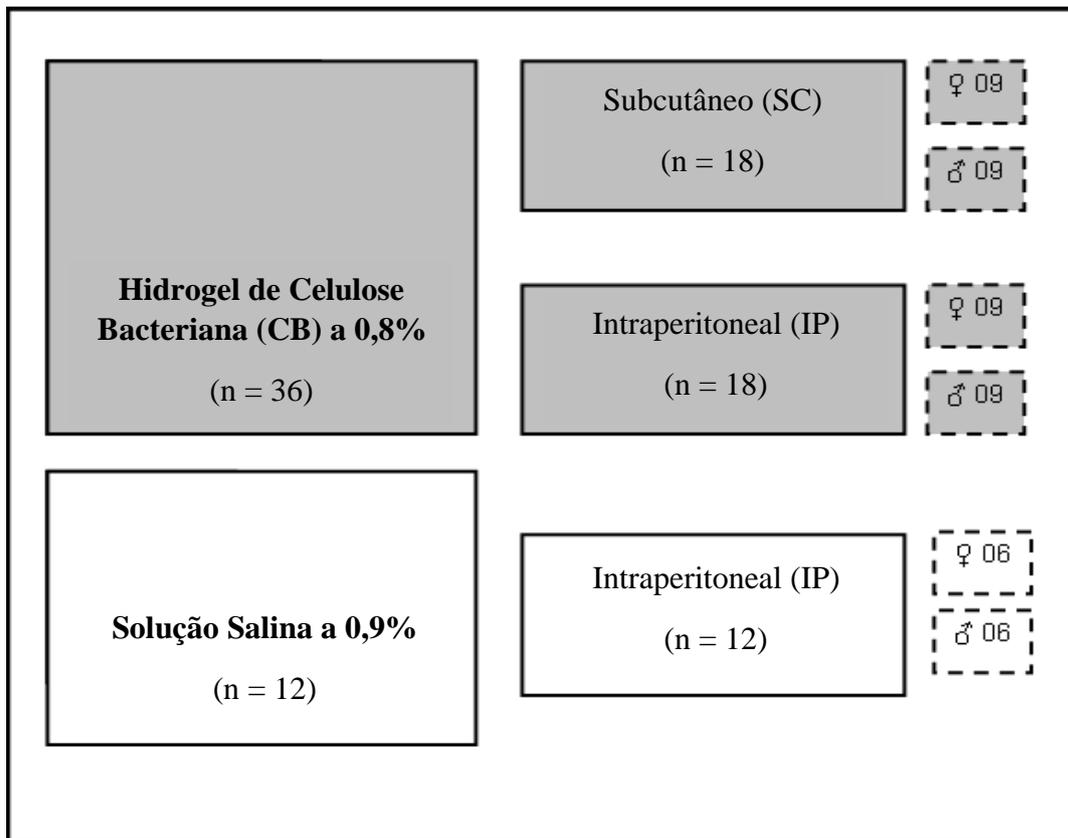


Fig.1. Diagrama ilustrativo do desenho do estudo.

A partir do segundo dia (D2) até ao vigésimo dia (D20) após o tratamento, todos os ratos foram pesados diariamente e examinados quanto a sinais e sintomas de toxicidade clínica. No 20º dia (D20), depois do exame clínico e procedimento de pesagem, os ratos foram anestesiados com a inalação de CO₂, e uma amostra de sangue (500 µL) foi feita por punção cardíaca, imediatamente antes da eutanásia por decapitação. Após a coagulação do sangue, o soro foi separado por centrifugação, transferido para frascos Eppendorf, congelado e armazenado a -20 °C até uso posterior.

Os ratos foram submetidos à laparotomia e os órgãos da cavidade peritoneal, abdominal e torácica foram examinados quanto a achados patológicos macroscópicos. O fígado, o baço e os rins foram removidos, pesados e fixados em uma solução de formalina tamponada a 10%. Um fragmento da pele e do tecido subcutâneo do local onde a CB foi

implantada também foi excisado e fixado em solução de formalina tamponada a 10% para posterior avaliação histopatológica.

2.4. Avaliação toxicológica

Todas as gaiolas dos ratos foram inspecionadas uma vez ao dia para detectar qualquer anormalidade comportamental e sinais clínicos de toxicidade, como hipo ou hiperatividade, piloereção, vocalização, perda de pelo, lacrimação, letargia, epistaxe, diarreia e outros.

2.4.1. Determinação de biomarcadores de lesão hepática no soro sanguíneo

As atividades de alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferase e fosfatase alcalina (ALP) foram determinadas por método colorimétrico, utilizando um kit comercialmente disponível (Laborclin[®], Pinhais, PR, Brasil), conforme relatado por outros autores (Reitman & Frankel, 1957). A absorvância foi medida a 505 nm em um leitor de espectrofotômetro de microplacas (Biochrom EZRead 2000) e os resultados foram expressos em UI/L.

2.4.2. Histopatologia

Após fixação em solução de formalina tamponada a 10%, as amostras de tecido foram processadas segundo procedimentos histotécnicos utilizados rotineiramente pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As amostras de tecido foram embebidas em blocos de parafina, seccionados (cortes com 4 µm de espessura), montados em lâminas e corados com picrossirius. As lâminas foram examinadas ao microscópio óptico por patologistas que

desconheciam o tratamento recebido pelos animais (avaliação às cegas) e o diagnóstico foi confirmado por um segundo avaliador, também cego ao tratamento.

A análise histológica da pele retirada do local da injeção avaliou a localização e a continuidade (homogeneidade) do implante subcutâneo de CB, a resposta inflamatória, o infiltrado celular (células polimorfonucleares, linfócitos e células gigantes multinucleares), a presença de fibroblastos e a ocorrência de neovascularização. Com base no percentual de células e novos vasos dentro do implante de CB, as lâminas da pele foram pontuadas da seguinte forma: 0 ou Ausência (0-5%), I ou leve (5-25%), II ou moderado (25-50%) e III para os achados mais intensos (>50%).

A morfometria das lâminas de tecido renal foi realizada sob um microscópio óptico Zeiss®, usando um software ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java - 1:446 *ImageJ*, National Institutes of Health, EUA). Foram quantificados os corpúsculos renais e a área do espaço capsular (ou espaço de Bowman). A área do espaço capsular renal foi a área da cápsula de Bowman menos a área do glomérulo.

2.4.3. Análise química de CB

Amostras de hidrogel de celulose bacteriana foram analisados por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN-1H) enquanto filmes de CB foram submetidos a análise elementar. Os espectros RMN-1H foram realizados utilizando o espectrômetro Varian Unity Plus®, operando a 300 MHz, utilizando D₂O como solvente. Foram utilizados pulso de RF de 45°, tempo de aquisição igual a 2,55s, tempo de pré-saturação igual a 2,00s e 128 repetições. A análise elementar foi realizada em duplicata, usando um Perkin Elmer 2400 CHNS/O Série II System®. A porcentagem de massa de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre foi determinada e o conteúdo de oxigênio foi a diferença. Não foi possível fazer uma análise elementar confiável do hidrogel, visto que seu peso (e teor de água) não era constante durante a análise.

2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste *post hoc* de Bonferroni. As proporções foram comparadas pelo teste exato de Fisher. De qualquer forma, uma diferença foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism® versão 3.0.

3. Resultados

3.1. Análise Química

A análise elementar de duas amostras (S1 e S2) de filmes de CB indicou que este biomaterial possui carbono (S1 42,94%; S2 43,43%), hidrogênio (S1 6,73%; S2 6,76%), nitrogênio (S1 0,28%; S2 0,23%) e oxigênio (S1 50,05%; S2 49,58%). Essa composição elementar proporcional, exceto por um pequeno conteúdo de nitrogênio, corresponde à esperada para carboidratos, cuja fórmula mínima é $(CH_2O)_n$ onde n é o número de unidades de carbono. RMN-1H espectros do hidrogel de CB detectaram um único sinal intenso em δ , 4,72 ppm, que pode ser atribuída à presença de água e grupos hidroxila.

3.2. Efeitos sistêmicos das injeções subcutâneas e intraperitoneais de CB

No 20º dia pós-tratamento, o peso do corpo dos ratos machos e fêmeas que receberam dose única (200 mg/kg pc) por injeção subcutânea ou intraperitoneal de CB não diferiu de machos e fêmeas do grupo de controle tratado com solução salina (Tabela 1). O ganho de peso corporal do dia 1 ao 20 do tratamento (D1-D20) também não diferiu entre os grupos injetados com CB e o grupo controle; no entanto, um aumento maior não significativo do peso corporal foi observado entre os machos tratados pela via subcutânea (Tabela 1). Nenhum comportamento anormal e nenhum sinal clínico de toxicidade foram

observados entre os ratos injetados com CB por uma das duas vias parentéricas em qualquer um dos 20 dias do período de observação. Além disso, as injeções subcutâneas ou intraperitoneais de CB não alteraram os pesos do fígado, rins e baço (Tabela 1), nem aumentaram os níveis de biomarcadores de lesão hepática, como atividades da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) ou fosfatase alcalina (ALP) no soro sanguíneo no D20 (Fig.2).

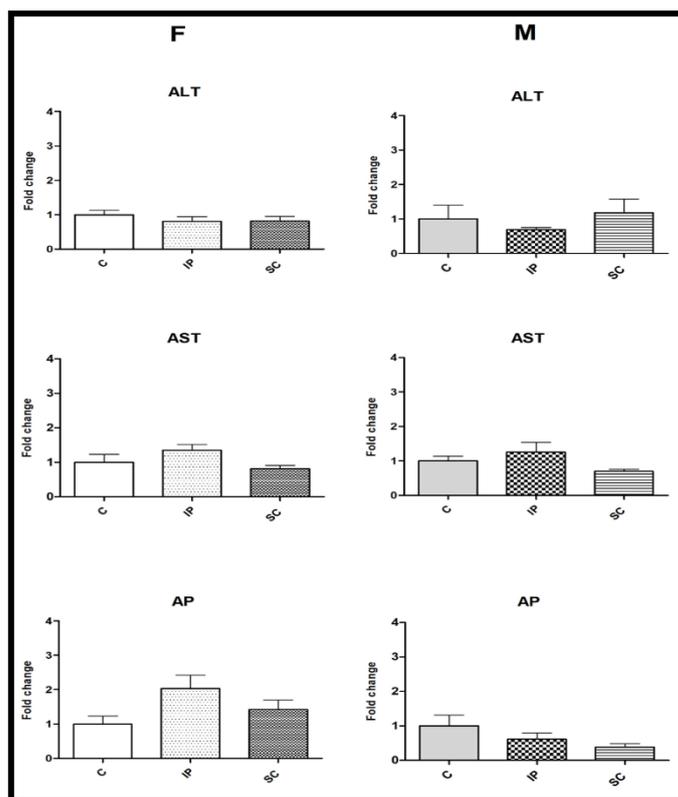


Fig.2. Ausência de efeitos de uma única injeção subcutânea (n = 9M, 9F) ou intraperitoneal (n = 9M, 9F) de hidrogel de CB (200 mg/Kg pc) em biomarcadores séricos de toxicidade hepática, medidos 20 dias após o tratamento. As alturas das barras do histograma representam alterações nas dobras (média \pm DP) das atividades de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina (ALP) no soro sanguíneo. Os ratos de controle (n = 6M, 6F) receberam uma injeção IP de solução de NaCl a 0,9% (4 mL/Kg pc). Atividade média do grupo controle = 1. As diferenças não foram significativas (ANOVA $p > 0,05$). Ratos M = machos; F = fêmeas.

Tabela 1. Efeitos de injeção única de hidrogel de CB (200 mg/Kg de peso corporal) sob a pele (CB-SC) ou na cavidade peritoneal (CB-IP) no ganho de peso corporal e no órgão (fígado, rins, baço) no dia 20 pós-tratamento. Os ratos do grupo controle receberam uma injeção intraperitoneal de solução de NaCl a 0,9% (IP salino, 4 mL/Kg de peso corporal) no 1º dia de tratamento.

Grupos	Sexo	N	O peso corporal no 20º dia (g)	Ganho de peso corporal pós-tratamento (dia 20 - dia 1) (g)	Peso do fígado (g)	Peso dos rins (g)		Peso do baço (g)
						Direito	Esquerdo	
CB-SC	F	9	194,8±16,0	194,8±16,0	8,1±1,1	8,1±1,1	0,8±0,1	0,8±0,1
	M	9	310,0 ± 24,3	86,6 ± 10,5	11,8 ± 1,0	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2
CB-IP	F	9	183,8 ± 14,2	40,8 ± 6,9	7,3 ± 1,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,1
	M	9	292,4 ± 18,3	73,8 ± 8,6	10,5 ± 1,5	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2
IP salino	F	6	241,8 ± 11,7	38,4 ± 8,7	7,1 ± 0,8	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,1
	M	6	294,7 ± 21,6	75,8 ± 8,9	9,8 ± 2,1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1

Os dados são médias ± DP. CB-SC, celulose bacteriana subcutânea; CB-IP, Celulose bacteriana - intraperitoneal. Peso corporal e peso dos órgãos (fígado, rim esquerdo, rim direito e baço): para comparações dentro do mesmo sexo (M, machos ou F, fêmeas), a análise estatística (ANOVA e teste *post hoc* de Bonferroni) não encontrou diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamento (CB-SC, CB-IP ou IP salino).

3.3. Análise Histopatológica

3.3.1. Exame dos rins

O exame das lâminas de tecido renal não revelou sinais de lesão celular tubular, dano glomerular ou vascular ou qualquer outra anormalidade associada ao tratamento com CB (Fig.3).

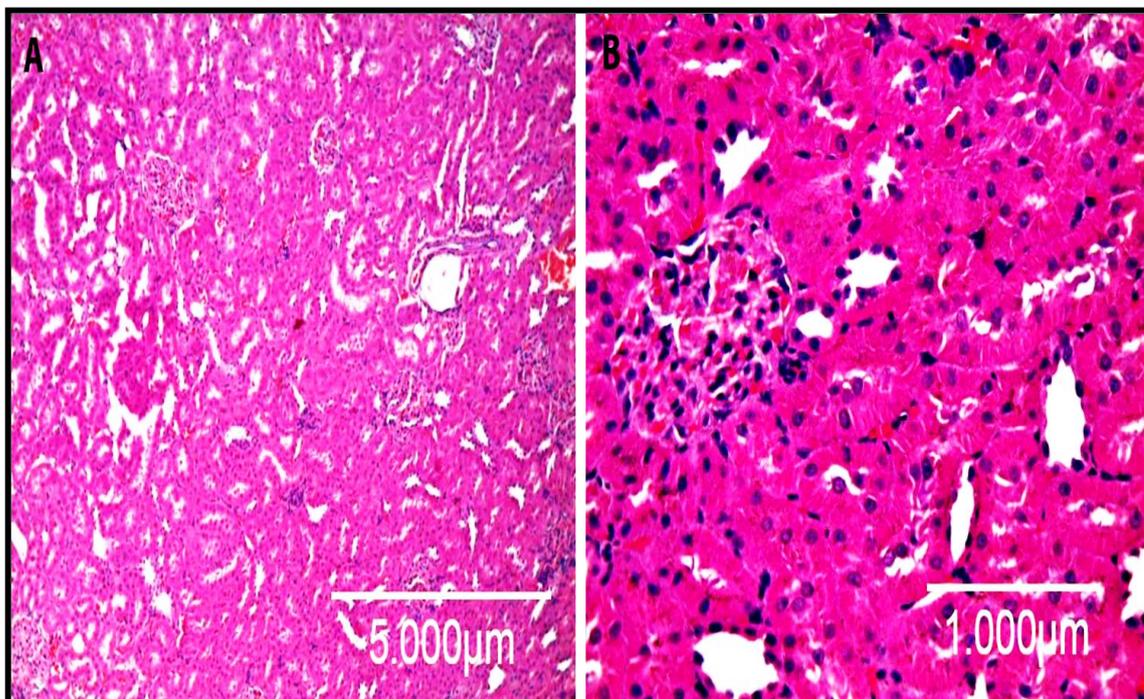


Fig.3. Fotomicrografias de seções do tecido renal (dia 20 após o tratamento) de ratos tratados com uma única injeção subcutânea ou intraperitoneal de CB (200 mg/Kg pc) em D1. **A e B** – Não foram notadas alterações histológicas toxicologicamente significativas. Coloração HE.

Na mesma linha, a análise morfométrica das lâminas de tecido renal não mostrou efeito adverso relacionado ao tratamento sobre o número médio de corpúsculos renais e a área da cápsula de Bowman, área do glomérulo e área do espaço capsular (Tabela 2).

Tabela 2. Análise morfométrica dos corpúsculos renais de ratos controle (solução de NaCl a 0,9%, IP salino, 4 mL/Kg pc/ip) e de ratos injetados com hidrogel CB (200 mg/Kg pc) sob a pele (CB-SC) ou na cavidade peritoneal (CB-IP). Os rins foram removidos 20 dias após o tratamento e as seções de tecido foram coradas com HE.

Grupos	Sexo	N	Área da cápsula de Bowman (μm^2)	Área glomerular (μm^2)	Espaço capsular [§] (μm^2)	Número médio de corpúsculos renais por unidade de área
CB-SC	F	9	7,6 ± 1,0	5,8 ± 0,8	1,8 ± 0,3	15,2 ± 4,8
	M	9	8,5 ± 0,9	6,5 ± 0,6	1,9 ± 0,4	12,9 ± 3,5
	F + M	18	8,1 ± 2,4	6,2 ± 0,8	1,8 ± 0,3	14,0 ± 4,4
CB-IP	F	9	7,5 ± 0,7	5,9 ± 0,6	1,6 ± 0,2	13,9 ± 4,8
	M	9	8,8 ± 0,8	6,8 ± 0,5	2,0 ± 0,3	11,0 ± 5,1
	F + M	18	8,1 ± 1,0	6,3 ± 0,7	1,8 ± 0,3	12,4 ± 5,2
IP salino	F	6	7,3 ± 0,7	5,5 ± 0,6	1,7 ± 0,2	14,6 ± 4,0
	M	6	8,9 ± 0,7	7,0 ± 0,8	1,9 ± 0,2	14,2 ± 3,2
	F + M	12	8,1 ± 1,1	6,3 ± 0,9	1,8 ± 0,2	14,4 ± 3,6

Os dados são médias ± DP. N, número; CB-SC, celulose bacteriana subcutânea; CB-IP, celulose bacteriana intraperitoneal. [§] = Espaço capsular ou Bowman. Para comparações dentro do mesmo sexo (M, machos ou F, fêmeas), a análise estatística (ANOVA e teste *post hoc* de Bonferroni) não encontrou diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos de tratamento (CB-SC, CB-IP ou Salina IP).

3.3.2. Histopatologia do tecido subcutâneo no local de implantação da CB

Nos ratos machos e fêmeas tratados, oito dos nove implantes de hidrogel CB foram encontrados imediatamente abaixo da camada de derme da pele, ou seja, no espaço intersticial entre o tecido subcutâneo e a fáscia muscular (Fig.4).

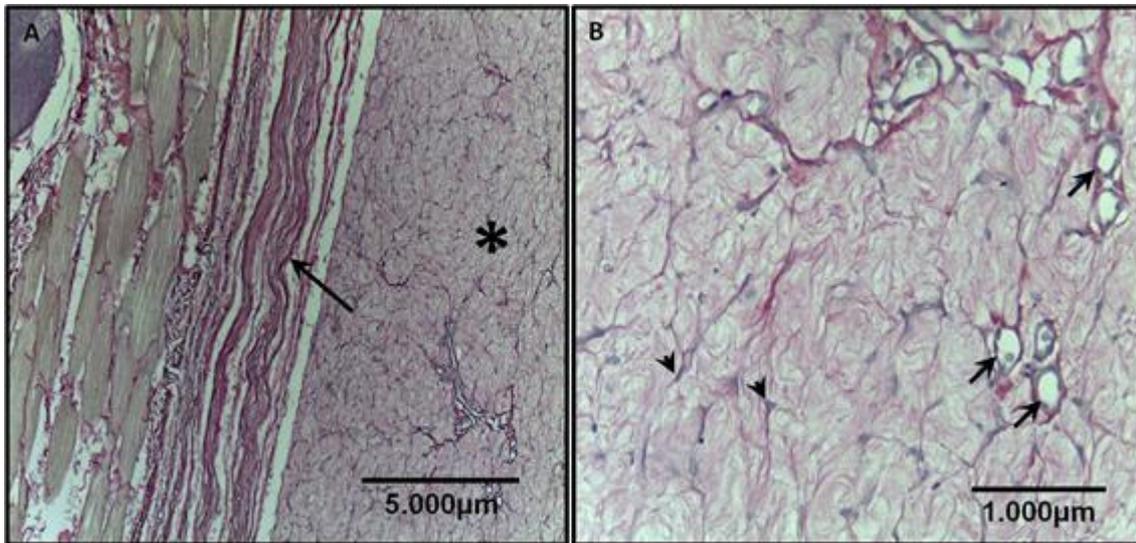


Fig.4. Fotomicrografia da pele no 20º dia pós-implantação de CB em ratos. **A** - Implante CB (asterisco) imediatamente abaixo da camada da derme (seta longa). **B** - Neovascularização (setas curtas) e fibroblastos (pontas de setas). Coloração Picrosirius.

É plausível pensar que nos dois animais restantes (um macho e uma fêmea) o hidrogel de CB implantado foi completamente absorvido antes do 20º dia do experimento (dia da eutanásia). O exame histológico também revelou que o gel de CB implantado era contínuo (homogêneo) em oito machos e fragmentado em outro, e contínuo em oito fêmeas (Tabela 3). Uma leve resposta inflamatória estava presente em todos os oito machos e fêmeas (100%) nos quais os implantes de CB estavam localizados sob a pele, enquanto os fibroblastos estavam ausentes em quatro (62,5%) machos e uma fêmea (12,5%). Não foram encontradas células mononucleares gigantes em seis machos (75%) e três fêmeas (77,5%), enquanto quatro fêmeas exibiram uma classificação leve (5-25%) e uma fêmea teve classificação moderada (25-50%) para predominância de células mononucleares gigantes (Tabela 3).

O implante de hidrogel de CB sob a pele levou à formação de novos vasos (neovascularização) na área do implante em 5 machos (62,5%) e 7 fêmeas (87,5%), cuja intensidade variou de leve a intensa (25%) entre os machos, e de leve (25%) a intensa (37,5%) nas fêmeas (Tabela 3).

Tabela 3. Principais achados do exame histopatológico da pele no local da injeção CB-SC (200 mg/Kg pc) em 9 ratos fêmeas e 9 machos.

Parâmetro		Fêmeas	Machos
Identificação de um implante de CB sob a pele	Presente	8 (88,9%)	8 (88,9%)
	Ausente	1 (11,1)	1 (11,1)
Continuidade (homogeneidade)	Contínuo	7 (77,8%)	8 (88,9%)
	Fragmentado	1 (11,1%)	0 (0%)
	Ausente	1 (11,1%)	1 (11,1%)
Células Multinucleares Gigantes (GMN)	Ausente (0%)	3 (37,5%)	6 (75,0%)
	Ligeiro (0-5%)	4 (50,0%)	2 (25,0%)
	Leve (25-50%)	1 (12,5%)	0 (0%)
	Intenso (> 50%)	0 (0%)	0 (0%)
Resposta inflamatória	Ausente (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Ligeiro (0-5%)	8 (100%)	8 (100%)
	Leve (25-50%)	0 (0%)	0 (0%)
	Intenso (> 50%)	0 (0%)	0 (0%)
Presença de fibroblastos	Ausente (0%)	1 (12,5%)	5 (62,5%)
	Ligeiro (0-5%)	7 (87,5%)	3 (37,5%)
	Leve (25-50%)	0 (0%)	0 (0%)
	Intenso (> 50%)	0 (0%)	0 (0%)
Neovascularização	Ausente (0%)	1 (12,5%)	3 (37,5%)
	Ligeiro (0-5%)	2 (25,0%)	0 (0%)
	Leve (25-50%)	2 (25,0%)	3 (37,5%)
	Intenso (> 50%)	3 (37,5%)	2 (25,0%)

Nota: A resposta inflamatória, a presença de fibroblastos e a neovascularização não foram visualizadas na região em que um implante de CB sob a pele estava ausente (um animal). CB, celulose bacteriana.

A laparotomia da cavidade peritoneal revelou que o implante de hidrogel não estava presente na cavidade. Não foram encontrados sinais flogísticos ou aderência do implante à cavidade. Conseqüentemente, o tecido intraperitoneal não foi excisado e a avaliação histopatológica não foi processada.

4. Discussão

O objetivo deste trabalho foi apresentar os resultados de um conjunto de testes de segurança não clínicos, incluindo avaliação toxicológica, análise histopatológica e química do hidrogel de CB obtida a partir de melação de cana-de-açúcar a 0,8% quando administrado pelas vias subcutânea e intraperitoneal em ratos Wistar.

A composição elementar proporcional, exceto por um pequeno conteúdo de nitrogênio, corresponde à esperada para carboidratos, cuja fórmula mínima é $(CH_2O)_n$, onde n é o número de unidades de carbono. Se os filmes de CB e os hidrogéis de CB (a partir dos quais os filmes de CB são formados) forem constituídos apenas por polissacarídeos à base de glicose, eles deverão ter uma composição proporcional ligeiramente diferente (ou seja, carbono 40%, hidrogênio 6,7% e oxigênio 53,3%) (Pavia et al., 2010). Com base nesse pequeno desvio dessa proporção, parece justo pensar que moléculas poliméricas de carboidratos, além da glicose, também possam estar presentes nos polissacarídeos de CB. O conteúdo pequeno, porém, significativo, de nitrogênio, por outro lado, sugere que as amostras de filmes de CB analisadas também podem conter uma pequena quantidade de polissacarídeos com uma cadeia lateral de nitrogênio ou outros compostos de nitrogênio.

O hidrogel de CB tem elevado teor de água e, portanto, o resultado do espectro RMN-1H na detecção de um único sinal intenso em δ , 4,72 ppm pode ser atribuído à presença de água e grupos hidroxila, sendo consistente com os achados de Pavia et al.

(2010), que evidenciou hidrogéis à base de polissacarídeo contendo vários grupos hidroxila e alguns grupos metileno.

Nenhum comportamento anormal ou sinal clínico de toxicidade foram observados entre os grupos tratados e o grupo controle, no 20º dia pós-tratamento. Essas injeções não alteraram os níveis de biomarcadores de lesão hepática (AST, ALT e ALP) no soro sanguíneo. Os resultados do exame histopatológico e da análise morfométrica dos rins, portanto, dão suporte à conclusão de que as injeções subcutâneas e intraperitoneais de CB não causaram efeitos adversos sistêmicos, em conformidade com o previamente relatado por Pinto et al. (2016), onde a CB também foi segura quando administrada por via oral em ratos, na dosagem de 2000 mg/Kg de peso corporal em dose única. A CB não teve efeito citotóxico e os dados também sugerem que a CB exerce efeito protetor contra a mielotoxicidade e genotoxicidade induzida por CP.

Os resultados obtidos no presente ensaio são consistentes com os de estudos anteriores, realizados por Castro et al. (2004), em que reportou um teste de citotoxicidade *in vitro* avaliando a viabilidade celular na membrana bacteriana da celulose pelo teste colorimétrico MTT (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) e onde os autores observaram 100% de viabilidade celular no grupo controle; 91,2% em PTFE (politetrafluoretileno); 43,6% na malha de polipropileno; 95,3% no grupo biopolímero, demonstrando que a membrana do biopolímero da cana-de-açúcar apresentou alta biocompatibilidade.

Como demonstrado por Pita et al. (2015) e Pinto et al. (2016), a celulose bacteriana, um produto de origem natural, possui uma estrutura química que consiste em açúcares polimerizados. Este biopolímero é estável, seguro e não é absorvido pelos tecidos circundantes. Indo de acordo com esse estudo, o presente trabalho evidenciou implantes subcutâneos de hidrogel de CB sob a camada dérmica da pele, uma leve resposta

inflamatória estava presente e a formação de novos vasos (neovascularização) foi evidenciada na maioria dos animais, sendo esses efeitos também confirmados por estudos anteriores (Rangel et al., 2006; Carvalho Junior et al., 2012; Cordeiro-Barbosa et al., 2012; Lima et al., 2015; Pita et al., 2015; Lima et al., 2017; Cavalcante et al., 2018; Gonçalves-Pimentel et al., 2018).

Afim com os resultados do presente estudo, a membrana de celulose bacteriana também mostrou propriedades adequadas de biocompatibilidade, sem reação imune, nem resposta inflamatória crônica, além da ausência de sinais de neurotoxicidade quando testada para avaliar o reparo de defeitos durais em ratos, de acordo com Lima et al. (2017).

Os estudos de revisão discutem os principais desenvolvimentos e desafios mais recentes em relação aos hidrogéis à base de celulose bacteriana ou nanocelulose que foram testados com sucesso. Portanto, o crescente interesse em materiais derivados de CB estabelece como uma grande promessa a melhoria na qualidade e nas funcionalidades da atual geração de materiais biomédicos. Assim, a diversidade deste material permite o direcionamento de muitas aplicações diferentes (Foresti et al., 2017; Picheth et al., 2017; Donini et al., 2018; Athukoralalage et al., 2019).

Em síntese, hidrogéis de nanocelulose foram utilizados para cultura de células 3D, imitando as propriedades da matriz extracelular (MEC) com baixa citotoxicidade. Para curativos e reparo de cartilagens, os géis de nanocelulose promovem a regeneração celular, fornecendo as propriedades mecânicas necessárias para os andaimes da engenharia de tecidos. O encapsulamento da terapêutica dentro da nanocelulose permite a entrega direcionada de medicamentos. Atualmente, a veiculação de celulose com peptídeos e proteínas permite uma nova geração de materiais inteligentes renováveis usados em diagnósticos. Por fim, a malha organizada de fibras contidas nos hidrogéis impulsiona aplicações na separação de biomoléculas e células, como demonstrado por

Curvello et al. (2019). No entanto, o hidrogel de celulose bacteriana emergiu como uma plataforma altamente projetável para múltiplas aplicações biomédicas, fornecendo fontes renováveis, de segurança e de baixo custo.

5. Conclusões

Em conclusão, a ausência de efeitos prejudiciais sobre o peso corporal e os órgãos (fígado, rim e baço) associados à falta de sinais e sintomas de toxicidade clínica indicados por injeções subcutâneas ou intraperitoneais de CB não causaram efeitos adversos sistêmicos em ratos. Em contraste com a presença conspícua de CB remanescente na área subcutânea do implante, a CB não foi encontrada na cavidade peritoneal 20 dias após a injeção. Os dados também indicaram que, independentemente da via parenteral utilizada para aplicação da CB, os ratos tratados exibiram um ganho de peso pós-tratamento semelhante ao do grupo controle e não apresentaram anormalidades comportamentais e sinais clínicos de toxicidade sistêmica ou local. Sinais de uma ligeira resposta inflamatória, fibrose, e neovascularização foram observadas no tecido subcutâneo no local de aplicação da CB no 20º dia pós-tratamento. No geral, os resultados são consistentes com estudos anteriores e sugeriram que a CB tem baixa toxicidade e que seus usos em procedimentos cirúrgicos são seguros.

Agradecimentos: Os autores agradecem as colaborações do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil; Departamento de Energia Nuclear (DEN), Centro de Geociências e Tecnologia (CTG), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife/PE, Brasil; Laboratório de Microscopia do Centro Acadêmico de Vitória (CAV), UFPE, Vitória de Santo Antão/PE, Brasil; Laboratório de Toxicologia Ambiental, Escola

Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ, Brasil; e Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e Naturais, CCEN, UFPE, Recife/PE, Brasil.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

- Albuquerque, P. C. U. C., Santos, S. M., Aguiar, J. L. A., Filho, N. P., De Mello, R. J. V., Costa, M. L. C. R. et al., (2011) Comparative macroscopic study of osteochondral defects produced in femurs of rabbits repaired with biopolymer gel cane sugar. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 46, 577–584.
- Athukoralalage, S. S., Balu, R., Dutta, N. K. & Roy Choudhury, N. (2019) 3D Bioprinted nanocellulose-based hydrogels for tissue engineering applications: A Brief Review. *Polymers*, 11(5), 898-910.
- Barros-Marques, S. R., Marques-Lins, E., De Albuquerque, M. C. & De Andrade-Aguiar, J. L. (2012) Sugarcane biopolymer patch in femoral vein angioplasty on dogs. *Journal of Vascular Surgery*, 55, 517–521.
- Carvalho Junior, A. M., Barkokébas, B. B., Aguiar, J. L. A., Lima, S. V. C. & Dambros, M. (2012) Characterization of the deposition of collagen fibers and Lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. *International Brazilian Journal of Urology*, 38, 544-551.
- Castro, C. M. M. B., Aguiar, J. L. A., Melo, F. A. D., Silva, W. T. F., Marques, E., et al., (2004) Citotoxicidade de Biopolímero de Cana-de-Açúcar. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco*, 49, 119-123.

- Cavalcante, A. R. T., Lima, R. P., Souza, V. S. B., Pinto, F. C. M., Campos Júnior, O., Silva, J. G. M. D. et al., (2018) Effects of bacterial cellulose gel on the anorectal resting pressures in rats submitted to anal sphincter injury. *Heliyon*. 4(12), e01058.
- Cordeiro-Barbosa, F. A., Aguiar, J. L. A., Lira, M. M. M., Pontes Filho, N. T. & Bernadino-Araújo, S. (2012) Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, 75(4), 267-272.
- Curvello, R., Raghuvanshi, V. S. & Garnier, G. (2019) Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 267, 47-61.
- Donini, I. A. N., Salvi, D.T. B., Fukumoto, F. K., Lustri, W. R., Barud, H. S., Marchetto, R., Messaddeq, Y. et al., (2018) Biosynthesis and recent advances in production of bacterial cellulose. *Eclética Química Journal*, 35(4), 165-178.
- Foresti, M. L., Vázquez, A. & Boury, B. (2017) Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. *Carbohydrate Polymers*, 157, 447–467.
- Fragoso, A. S., Silva, M. B., De Melo, C. P., Aguiar, J. L., Rodrigues, C. G., De Medeiros, P. L., et al. (2014) Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord on a sugarcane biopolymer. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25, 229–237.
- Gonçalves-Pimentel, C., Moreno, G. M. M., Trindade, B. S., Isaac A. R., Rodrigues, C. G., Savariradjane, M., et al., (2018) Cellulose exopolysaccharide from sugarcane molasses as a suitable substrate for 2D and 3D neuron and astrocyte primary cultures. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 29(9), 139.

- Lima, S. V. C., Rangel, A. E. O., Lira, M. M. M., Pinto, F. C. M., Campos Junior, O., Sampaio, F. J. B. et al., (2015) The Biocompatibility of a Cellulose Exopolysaccharide Implant in the rabbit bladder when compared with Dextranomer microspheres plus hyaluronic acid. *Urology*, 85, 1520-1526.
- Lima, F. M. T., Pinto, F. C. M., Andrade-Da-Costa, B. L. S., Silva, J. G. M., Campos Júnior, O. et al., A. (2017) Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural defect repair of rat. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 28(3), 37.
- Lucena, R. G., Vilar, F. O., Andrade, R. T., Pinto, F. C. M. & Lima, S. V. C. (2015) Experimental use of a cellulosic biopolymer as a new material for suburethral sling in the treatment of stress urinary incontinence. *International Braz J Urol (Online)*. 41:1148-1153.
- Lucena, M. T, Melo Júnior M. R., Lira, M. M. M., Castro, C. M. M. B., Cavalcanti, L. A., Menezes, M. A., Pinto, F. C. M. et al., (2015) Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 26(2), 82.
- Martins, A. G. S., Lima, S. V. C., Araujo, L. A. P., Vilar, F. O. & Cavalcante, N. T. P. A. (2013) Wet dressing for hypospadias surgery. *International Brazilian Journal of Urology*, 39(3), 408-413.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. & Vyvyan, J. (2010) Introdução à Espectroscopia, 4ª Edição, Cengage, 733p.
- Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N. et al., (2017) Bacterial cellulose in biomedical applications: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 97-106.

- Pinto, F. C. M., Oliveira, A. C. A. X., Carvalho, R. R., Carneiro, M. R. G., Coelho, D. R., Lima, S. V. C., Paumgarten, F. J. R. et al., (2016) Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. *Carbohydrate Polymers*, 137, 556-560.
- Pita, P. C. C., Pinto, F. C. M., Lira, M. M. M., Melo, F. A. D., Ferreira, L. M. et al., (2015) Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 30, 296-300.
- Rangel, A. E. O., Aguiar, J. L. A., Lima, S. V. C. & Vilar F. (2006) A new biomaterial for the treatment of vesicoureteral reflux: Experimental study. *International Brazilian Journal of Urology*. 32, 184.
- Reitman, S. & Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28, 56-63.
- Silveira, F. C. A., Pinto, F. C. M., Caldas Neto, S. S., Leal, M. C., Cesário, J. & Andrade, J. L. A. (2016) Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 82(2), 203–208.
- Silveira, R. K., Coelho, A. R. B., Pinto, F. C. M., Albuquerque, A. V., Melo Filho, D. A., et al., (2016) Bioprosthetic mesh of bacterial cellulose for treatment of abdominal muscle aponeurotic defect in rat model. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 27, 129.

