

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

LARISSA GIORGETTI MENDES

"MEMBRANAS DE POLI (ÓXIDO DE ETILENO) E TROMBINA ELETROFIADAS PARA REPARO DE LESÕES TECIDUAIS"

CAMPINAS 2020

LARISSA GIORGETTI MENDES

"MEMBRANAS DE POLI (ÓXIDO DE ETILENO) E TROMBINA ELETROFIADAS PARA REPARO DE LESÕES TECIDUAIS"

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.ª Drª Lucia Helena Innocentini Mei

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LARISSA GIORGETTI MENDES E ORIENTADA PELA Prof.ª. DRª. LUCIA HELENA INNOCENTINI MEI.

> CAMPINAS 2020

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

 Mendes, Larissa Giorgetti, 1985-Membranas de poli (óxido de etileno) e trombina eletrofiadas para reparo de lesões teciduais / Larissa Giorgetti Mendes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.
 Orientador: Lucia Helena Innocentini Mei. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
 1. Eletrofiação. 2. Poli (oxido de etileno) - PEO. 3. Agentes de coagulação.
 4. Cicatrização de feridas. I. Mei, Lucia Helena Innocentini, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Electrospun poly (ethylene oxide) and thrombin membranes for tissue injury repair Palavras-chave em inglês: Electrospinning Poly (ethylene oxide) - PEO Clotting agents Wound healing Área de concentração: Engenharia Química Titulação: Doutora em Engenharia Química Banca examinadora: Lucia Helena Innocentini Mei [Orientador] Elias Basile Tambourgi Roniérick Pioli Vieira Rodrigo Lambert Oréfice Elizabeth Ferreira Martinez Data de defesa: 28-08-2020 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a) - ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-3804-3079

⁻ Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/0802664967864824

Folha de Aprovação da Defesa de Tese de Doutorado defendida por Larissa Giorgetti Mendes em 28 de agosto de 2020 pela banca examinadora constituída pelos doutores.

Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei - Presidente e Orientadora FEQ / UNICAMP (Videoconferência)

Prof. Dr. Elias Basile Tambourgi FEQ / UNICAMP (Videoconferência)

Prof. Dr. Roniérik Pioli Vieira FEQ / UNICAMP (Videoconferência)

Dr. Rodrigo Lambert Oréfice Universidade Federal de Minas Gerais (Videoconferência)

Dra. Elizabeth Ferreira Martinez São Leopoldo Mandi (Videoconferência)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontrase no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Aos meus avós, Emílio, Selestia e Zeca, que durante minha trajetória no doutorado, partiram deste plano, mas deixaram as lembranças e seus valores para eu poder seguir meu caminho.

AGRADECIMENTO

À Deus pela permissão de poder cumprir minha missão.

Ao meu marido Cyro, pela compreensão, colaboração, apoio e incentivo para não desanimar e nem desistir. À minha mãe Helena, pela insistência em me colocar no caminho certo e não desistir de meus objetivos. Ao meu paidrasto Gilson pelo incentivo constante e por influenciar minha trajetória nos estudos. Ao meu pai Sérgio e meus 8 irmãos pelo apoio e confiança.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (processo nº 140881/2015-8).

À minha orientadora, Prof.^a Dr^a Lucia Helena Innocentini Mei pela oportunidade da realização deste trabalho, pela confiança, pelo suporte e pôr ao longo dos anos que trabalhamos juntas, sempre me incentivar a superar os limites que eu mesma me impunha, pois via a minha capacidade de ir além.

À Prof.^ª Dr^ª Cristina Vicente Pontes, do Instituto de Biologia da Unicamp, por todo apoio e suporte na elaboração e desenvolvimento do trabalho experimental com os animais e demais dúvidas para com as questões biológicas deste trabalho, à todos do Laboratório de Aterosclerose, Trombose e Terapia Celular pelo suporte, em especial à Michele S. Sielski pela colaboração nas análises e Luiz Henrique de Freitas Filho pelo apoio com minhas dúvidas nada básicas. Ao aluno de doutorado Jhonne Torres, também do IB, por todo suporte na preparação das minhas amostras da análise *in vivo*. Ao pref.º Drº Francisco Groppo e ao Drº Jonny Burga da Faculdade de Odontologia da Unicamp pela realização e suporte nas análises de viabilidade celular.

Ao Pref.º Sébastien Livi da Engenharia de Materiais Poliméricos da Universidade de Lyon/França, pela análise de DMA.

Ao Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC), pelo desenvolvimento do FTIR e MEV.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia - LNNano pela disponibilidade do MEV, e ao Dr. Mauricio L. Sforça e Dr. Silvana A. Rocco do Laboratório Nacional de Biociências – LNBio pela disponibilidade do RMN – Dosy, ambos laboratórios situados dentro do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM.

À irmã que ganhei durante o doutorado, futura doutora, Karine Cappuccio de Castro, que foi fundamental para que este trabalho saísse, minha parceira em todos os momentos desta jornada dentro do laboratório e à distância.

Ao Filipe Vargas Ferreira pelo apoio e desenvolvimento das análises no CNPEM e na Universidade de Lyon.

À Sr.ª Maria, por todas as doses de café no meio da tarde, que animou e salvou muitos de nossos dias no laboratório.

E a todos os amigos do BIOMAT que passaram pela minha vida ao longo desses anos: Carol, Silvia, Ívi, Ivanei, Ananda, Tami e os demais que fizeram parte desse momento e que me ajudaram, direta ou indiretamente.

"Todo mundo deseja a boa sorte, mas para ser afortunado, o homem precisa semear o bem."

Meishu - Sama

RESUMO

Neste projeto, foram desenvolvidas membranas nanoestruturadas de poli (óxido de etileno) - PEO eletrofiadas, com adição de trombina como agente bioativo, para investigar seu potencial no processo de cicatrização de lesões. As membranas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (ATR – FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN-Dosy), espectroscopia de dicroísmo circular (CD), análise dinâmicomecânica (DMA) e espectroscopia no ultravioleta (UV-Vis). As análises mostraram a formação das fibras com diâmetro médio na faixa de 190 nm e a não interferência da adição da trombina na sua morfologia. A trombina manteve sua estrutura secundária, interagiu com o PEO e permaneceu ativa nas membranas após o processo. Análises biológicas para avaliar a citotoxicidade do material, seu potencial na migração in vitro e no crescimento celular in vivo foram realizadas (MTT, Live/Dead, Scratch Assay). Como resultado o material não apresentou toxicidade para células, e as membranas contendo 4 e 8 UI/mL de trombina propiciaram uma migração celular em torno de 69%. Os ensaios in vivo mostraram que a membrana contendo 8 UI/mL apresentou maior número de macrófagos e maior contração da ferida no 2º dia de análise e maior angiogênese no 6º dia após a lesão. Enquanto as membranas contendo 2 e 8 Ul/mL apresentaram maior espessura do epitélio no 2º dia após a lesão. Esses resultados mostram que o material é promissor, eficiente e pode acelerar o início da cicatrização.

Palavras-chave: Eletrofiação; poli (óxido de etileno); trombina; cicatrização

ABSTRACT

In this project, electro-spun poly (ethylene oxide) nanostructured membranes were developed, with the addition of thrombin as a bioactive agent, capable of accelerating the wound healing process. Physicochemical characterization of the membranes were made by scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (ATR - FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR-Dosy), circular dichroism spectroscopy (CD), dynamic-mechanical analysis (DMA) and ultraviolet spectroscopy (UV-Vis). The analyzes showed fibers with an average diameter of 190 nm and no interference in its morphology after the addition of thrombin. Thrombin maintained its secondary structure, interacted with the PEO chains and remained active in the membranes after the process. Biological analyzes were performed to evaluate the material's cytotoxicity, its potential for in vitro migration and cell growth in vivo (MTT, Live / Dead, Scratch Assay). As a result, the material was non-toxic to cells, and the membranes containing 4 and 8 IU / mL of thrombin provided a cell migration of around 69%.

The *in vivo* tests showed that the membrane containing 8 IU/mL showed a greater number of macrophages and greater contraction of the wound on the 2nd day of analysis and greater angiogenesis on the 6th day after the injury. While the membranes containing 2 and 8 IU/mL presented greater epithelial thickness on the 2nd day after the injury. These results showed that the material has great potential to accelerate the healing process.

Keywords: Electrospinning; poly (ethylene oxide); thrombin; wound healing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Equipamento de eletrofiação.	32
Figura 2 - Membrana obtida pelo processo de eletrofiação.	33
Figura 3 - Fórmula estrutural do monômero do polímero poli (óxido	36
de etileno).	
Figura 4 - Ilustração da fita da cadeia polipeptídica da trombina	41
humana.	
Figura 5 - Desenho esquemático das interações iônicas dentro da	42
cadeia A da trombina e entre a cadeia A da trombina (conexões em	
negrito) e a cadeia B (conexões duplas).	
Figura 6 - (A) Esquema da estrutura da pele e (B) corte histológico.	45
Figura 7 - Modelo da coagulação baseado em superfícies celulares.	47
Figura 8 - As quatro fases da cicatrização aguda de feridas.	51
Figura 9 - Esquema do processo de eletrofiação das nanofibras de	55
PEO com trombina.	
Figura 10 - Espectros de dicroísmo circular típico.	64
Figura 11 - Membranas fixadas em ganchos.	68
Figura 12 - Camundongo após procedimento cirúrgico e com	73
curativo de micropore para fixar a membrana.	
Figura 13 - Imagens de MEV das membranas de PEO sem e com	79
trombina, com diferentes concentrações do polímero e vazão da	
solução no processo de eletrofiação. Aumento de 10000 vezes.	

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de 86 membranas eletrofiadas com PEO 2,5% com aumento de 20000

vezes: A – 0,5 mL/h; B – 1,0 mL/h; C – 1,5 mL/h; D – 2,0 mL/h.

Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de 89 membranas eletrofiadas com PEO 4,5% com aumento de 20000 vezes: A - 0,5 mL/h; B - 1,0 mL/h; C - 1,5 mL/h; D - 2,0 mL/h.

Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de 91 membranas eletrofiadas de PEO 6,5% com aumento de 20000 vezes: A - 0,5 mL/h; B - 1,0 mL/h.

Figura 17 - Membranas PEO 4,5% com trombina 2 UI/mL - 10000 e 93 120000 vezes de aumento e histograma da variação do tamanho das fibras.

Figura 18 - Membranas PEO 4,5% com trombina 4 UI/mL - 10000 e 94 120000 vezes de aumento e histograma da variação do tamanho das fibras.

Figura 19 - Membranas PEO 4,5% com trombina 8 UI/mL - 10000 e 95 120000 vezes de aumento e histograma da variação do tamanho das fibras.

Figura 20 - Espectro FTIR em modo transmitância da membrana de 97 PEO puro, membrana de PEO/trombina e da solução de trombina.

Figura 21 - (A) espectros de ¹H RMN de PEO (verde), trombina 101 (azul) e PEO/T2U (magenta) e (B) zoom dos espectros de ¹H RMN.
(C) Coeficientes de difusão determinados a partir de medições de ¹H DOSY das amostras PEO (verde) e PEO / trombina (magenta) e (D) zoom dos espectros ¹H DOSY.

Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular da trombina pura (A) e 105 das membranas com trombina (B).

Figura 23 - Atividade da trombina nas membranas de PEO e em 112 solução tampão, PEO/T2U (A), PEO/T4U (B) e PEO/T8U (C).

Figura 24 - Viabilidade celular após 1h (a) e após 24h (b) de 117 exposição ao tratamento. (n=6, NS: não significativo, *: p < 0.01, ANOVA - Tukey).

Figura 25 - Viabilidade celular após 1he 24h de exposição ao 119 tratamento. Aumento 10x.

Figura 26 - Viabilidade celular após 1h (verde) e após 24h (azul) de 122 exposição ao tratamento. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos nos diferentes tempos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).

Figura 27 - Evolução do teste de migração celular, controle, T2U, 124/125 T4U e T8U, PEO puro, PEO/T2U, PEO/T4U e PEO/T8U nos tempos iniciais e finais.

Figura 28 - Migração celular *in vitro* após 24h de exposição ao 127 tratamento (A) e em 6, 12, 18 e 24h após a exposição ao tratamento
(B) (n=4, p < 0.05, ANOVA - Tukey).

Figura 29 - Imunofluorescência de cortes transversais da área da 130 lesão em pele de dorso de camundongo nos diferentes grupos estudados, no 2º dia após a cirurgia, com o marcador CD 68 de macrófago. Os núcleos estão corados com DAPI (azul) e os citoplasmas estão corados com FITC (verde), MERGE é a sobreposição das imagens. Aumento 10x.

Figura 30 - Número total de macrófagos na região da lesão dos 131 diferentes grupos experimentais. * - diferença significativa em relação

ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=4, p < 0.05, ANOVA - Tukey).

Figura 31 - Coloração em Hematoxilina e Eosina de cortes 133 transversais da área da lesão em pele de dorso de camundongo nos diferentes grupos estudados. Destaque para epiderme (asterisco). Aumento 10x. Barra = 100 μm.

Figura 32 - Número de vasos neoformados na região da lesão dos 135 diferentes grupos experimentais. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).</p>

Figura 33 - Medidas da espessura do epitélio (μm) em três pontos 136 (marcações em amarelo).

Figura 34 - Espessura do epitélio (μm) na região da lesão dos 137 diferentes grupos experimentais. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).

Figura 35 - Coloração em Tricômio de Masson de cortes 139 transversais da área da lesão em pele de dorso de camundongo nos diferentes grupos estudados no 10º dia após a lesão. Destaque para fibras colágenas (seta amarela). Aumento 10x.

Figura 36 - Porcentagem de área ocupada por fibras colágenas em 140 relação ao total de reparo na região da lesão dos diferentes grupos experimentais no 10º dia após a lesão (n=4, p < 0.05, ANOVA - Tukey).

Figura 37 - Grau de contração da ferida dos diferentes grupos 141

experimentais. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variação dos parâmetros analisados, concentração e57vazão no processo de eletrofiação.

Tabela 2 - Distribuição dos animais por grupos de estudo e tratamento74utilizado.

Tabela 3 - Variação do diâmetro das fibras de PEO em função dos80fatores analisados.

Tabela 4 - Dados de viscosidade, tensão superficial e condutividade82elétrica das soluções de PEO e PEO com trombina.

Tabela 5 - Valores do módulo de armazenamento (E ') e Tg de PEO e109PEO / trombina.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ECM	Matriz extracelular
PEO	Poli (óxido de etileno)
PCL	Policaprolactona
FT	Fator tecidual
FXa/FVa	Protrombinase
FII	Protrombina
FIIa	Trombina
FIXa/FVIIIa	Tenase
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
AT	Antitrombina
TNF – α	Fator de necrose tumoral α
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
TGF – β	Fator de crescimento β
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
UI/mL	Unidade internacional de atividade por mililitro
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
DMA	Análise dinâmico-mecânica
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
RMN	Espectroscopia da ressonância magnética nuclear
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
UR	Umidade relativa

CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
LRAC	Laboratório de Caracterização de Biomassa, Recursos Analíticos e de Calibração
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
D ₂ O	Água deuterada
mM	milimol
Tris-HCI	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
NaCl	Cloreto de sódio
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbrometo
HaCaT	Linha de células queratinócitos
PBS	Tampão fosfato-salino
DMEM	Meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
EtHD-1	Homodímero-1
μM	micromol
SBF	Soro fetal bovino
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
C57/BI6	Camundongos geneticamente modificados
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
MAC I CD 68	Anticorpo para identificação de macrófagos
CD	Dicroísmo Circular
DOSY	Espectroscopia de difusão ordenada
Dbppste	Par de pulso bipolar eco-estimulado com compensação de convecção
SCR	Grau de fechamento da ferida
do	Distância entre as bordas da ferida no tempo inicial
d ₂	Distância entre as bordas da ferida no tempo analisado

A	Área da ferida
R	Raio maior da ferida
r	Raio menor da ferida
С	Grau de contração da ferida
Ao	Área inicial da ferida
Ai	Área da ferida no dia da biópsia
FEQ	Faculdade de Engenharia Química

SUMÁRIO

1.	INTROD	DUÇÃO	22		
2. 0	2. OBJETIVO GERAL				
2.1.	Objetivo	os Específicos	29		
3.	REVISÃ	O BIBLIOGRÁFICA	31		
3.1.	Eletrofia	ıção (<i>ELECTROSPINNING</i>)	31		
3.2.	Poli (Óx	ido de Etileno) – PEO	36		
3.3.	Trombin	na	38		
3.4.	Lesões	na Pele e Processos de Cicatrização	45		
3.5.	Feridas	de Difícil Cicatrização	51		
4.	MATER	IAIS E MÉTODOS	55		
4.1.	Process	o de fabricação das membranas com e sem trombina	56		
4.2.	Caracte	rização das soluções poliméricas com e sem trombina	58		
	4.2.1.	Viscosidade	59		
	4.2.2.	Tensão superficial	59		
	4.2.3.	Condutividade elétrica	59		
4.3.	Caracte	rização físico-química das membranas com e sem trombina	60		
	4.3.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	60		
	4.3.2.	Análise de grupamentos químicos por ATR - FTIR	60		
	4.3.3.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	61		
	4.3.4.	Experimentos de difusão (DOSY)	62		
	4.3.5.	Dicroísmo Circular (CD)	63		
	4.3.6.	Ensaio Mecânico – DMA	64		
	4.3.7.	Estudo da atividade da Trombina (UV-Vis)	65		
4.4.	4.4. Caracterização biológica67				
	4.4.1.	Teste de Viabilidade celular- MTT	67		
	4.4.2.	Teste de Viabilidade celular - Live/Dead	69		
	4.4.3.	Teste de migração celular in vitro – Scratch Assay	70		
	4.4.4.	Teste de cicatrização in vivo	72		
	4.4.4.1.	Análise Estatística	76		
5.	RESUL	TADOS E DISCUSSÕES	77		
5.1. Produção das membranas com e sem trombina77			77		
5.2. Caracterização das soluções poliméricas 81					
5.3. Caracterização físico-química das membranas com e sem trombina 85					

	5.3.1.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	85
	5.3.2.	Análise de grupamentos químicos por ATR - FTIR	96
	5.3.3.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e DOSY	100
	5.3.4.	Dicroísmo Circular (CD)	104
	5.3.5.	Ensaio Mecânico – DMA	108
	5.3.6.	Estudo da atividade da Trombina na membrana (UV-Vis)	111
5.4.	Caracte	rização biológica	. 116
	5.4.1.	Teste de Viabilidade celular – MTT	116
	5.4.2.	Teste de Viabilidade celular - Live/Dead	118
	5.4.3.	Teste de migração celular in vitro	123
	5.4.4.	Teste de cicatrização in vivo	128
6.	CONCL	USÕES	143
7.	SUGES	TÕES DE TRABALHOS FUTUROS	146
8.	REFERÉ	ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
9.	ANEXO	S	162

1. INTRODUÇÃO

As doenças crônicas, não transmissíveis, representam atualmente 38 milhões de casos de óbitos por ano no mundo e, desses casos, mais de 14 milhões de mortes ocorrem entre as idades de 30 a 70 anos, sendo 85% destas em países em desenvolvimento. No Brasil, esses tipos de doenças são igualmente importantes, com destaque para as do aparelho circulatório (31%), neoplasias (17%), doenças respiratórias crônicas (6%) e diabetes *mellitus* (6%), sendo esta última uma das principais causas de lesões crônicas (OLIVEIRA et al., 2019).

O diabetes *mellitus* representa um importante problema de saúde pública no mundo todo, que atinge cerca de 382 milhões de pessoas. Atualmente, 80% destas pessoas vivem em países de baixa e média renda. Desse número, 11,9 milhões de pessoas vivem no Brasil, onde a doença se concentra em indivíduos com menor escolaridade e de idade mais avançada (OLIVEIRA et al., 2019).

Nesse contexto, os pacientes que desenvolvem lesões crônicas de pele acabam por tentar soluções próprias, baseadas em cuidados não comprovados cientificamente. Muitas vezes, por recomendações de leigos, realizam terapias inadequadas e inseguras, provocando riscos à sua saúde e afetando a qualidade de vida (DIAS; SILVA, 2006).

Atualmente, as feridas crônicas são tratadas com uma ampla variedade de curativos adaptados aos tipos da ferida (seca ou exsudada, limpa ou infectada, superficial ou profunda), sendo vários os tipos de curativos desenvolvidos, incluindo borracha, espuma, hidrocolóide, membrana e hidrogel (ZHAO et al., 2017). Os curativos mais simples, como gazes e bandagens, protegem a ferida de trauma mecânico e infiltração bacteriana, além de permitirem trocas gasosas e fluidas; eles são usados como suporte para curativos mais complexos ou para o tratamento de feridas superficiais, rasas e não infectadas. A maioria das feridas crônicas requer um controle específico dos níveis de umidade, estando disponíveis no mercado vários curativos, incluindo hidrocolóides e alginatos, capazes de manter ou fornecer níveis adequados de umidade (ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014).

No entanto, dispositivos mais avançados são capazes de reduzir a carga bacteriana no leito da ferida, liberando agentes antimicrobianos como iodo ou prata; além disso, aumentam a velocidade de cicatrização e a deposição de princípios ativos diretamente no local da ferida. Embora esses curativos tenham melhorado significativamente o gerenciamento de feridas, ainda há um número grande de pesquisas focando o desenvolvimento de dispositivos cada vez mais eficientes. Procura-se obter dispositivos capazes de, efetivamente curar feridas crônicas, durante o combate à infecção, evitando problemas na manipulação do curativo além de diminuírem o tempo prolongado de recuperação, que torna mais doloroso o processo de regeneração dos tecidos (FERREIRA; PAGGIARO, 2010; OLIVEIRA et al., 2019).

Nesse sentido, membranas obtidas por eletrofiação para aplicação como biomaterial, tais como *scaffolds* (arcabouços) para aplicação na engenharia de tecidos, curativos artificiais, dispositivos para liberação controlada de medicamentos, dentre outras aplicações, vem se destacando cada vez mais nas pesquisas, seja pela facilidade na fabricação ou pela capacidade de se assemelhar aos tecidos biológicos, uma vez que se apresentam em escala nanométrica. Sendo assim, novos tipos de biomateriais têm sido aperfeiçoados para a utilização em cirurgias reconstrutivas, trazendo com isso um grande desenvolvimento para o campo da engenharia de tecidos (DADO; LEVENBERG, 2009).

A eletrofiação (*electrospinning*) é atualmente uma das tecnologias mais promissoras para a obtenção de fibras nanoestruturadas, sendo um procedimento simples e versátil na produção de fibras poliméricas, que pode alcançar diâmetros na ordem de algumas dezenas a centenas de nanômetros, ampliando assim a área de contato de dispositivos curativos (ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014; DEMIR, 2010).

Biomateriais nanofibrosos, obtidos com polímeros sintéticos e/ou naturais biodegradáveis, pela técnica de eletrofiação, com ou sem a presença de bioativos, se constituem em *scaffolds* promissores para aplicação em engenharia de tecidos, devido à similaridade com matrizes extracelulares (ECM) naturais (SILL; VON RECUM, 2015). Portanto, estudos mais detalhados de órgãos e tecidos do corpo humano fazem-se necessários, para que o desenvolvimento de novos biomateriais seja consolidado.

Dentre vários órgãos, o estudo sobre as funções da pele é de considerável relevância, haja vista que se trata do maior órgão do corpo humano e muito susceptível a danos provocados pelo ambiente. Suas lesões podem ocorrer com ou sem perda de tecidos, obrigando o organismo a iniciar um processo de cicatrização com o intuito de reestruturar o local afetado. No decorrer desse processo, muitos fatores podem interferir e causar desvios na sequência de cicatrização, como no caso de uma lesão crônica na fase

inflamatória que pode dificultar a recuperação de pacientes (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Feridas de difícil cicatrização, como a de pacientes portadores de diabetes *mellitus*, por exemplo, constituem um desafio encontrado por médicos na cura de inúmeros pacientes, incentivando as pesquisas desenvolvidas na área (OLIVEIRA et al., 2019).

Dificuldades com os tratamentos convencionais, como o tempo prolongado de recuperação, problemas na manipulação do curativo e/ou o custo do tratamento, torna mais demorado e doloroso o processo de regeneração dos tecidos (OLIVEIRA et al., 2019). E é por esse motivo que se faz necessário o desenvolvimento de novos tratamentos e/ou dispositivos mais avançados, capazes de reduzir a carga bacteriana e melhorar o gerenciamento de feridas de forma efetiva, tem sido a busca de muitos pesquisadores.

Para suprir esses desafios, a utilização de terapias, com componentes do sangue, como a trombina, fatores de crescimento e plasma rico em plaquetas, para a cicatrização das lesões de pele, vem ganhando destaque científico e tem demonstrado grande potencial na cura de lesões (EVERLAND et al., 2013; HUANG et al., 2015; XIE et al., 2013; ZIV-POLAT et al., 2010).

A trombina tem um papel importante no processo de coagulação, fundamental no reparo de lesões da pele e, por isso, vem ganhando destaque nas terapias de recuperação (GUGERELL et al., 2014; HUANG et al., 2015; LOPES et al., 2005), e vem sendo indicada para o tratamento da hemostasia em cirurgia, juntamente com o fibrinogênio, para promover o selamento de tecidos e suporte na sutura de cirurgias vasculares quando as técnicas padrão demonstram ser insuficientes. Além desta aplicação, a trombina também é requerida no processo de formação de coágulos durante o uso do curativo Gelfoam®, para uso apenas hospitalar, que vai atuar através da liberação de tromboplastina das plaquetas, que ocorre através do choque destas com as paredes dos interstícios do curativo, onde a tromboplastina reage com protrombina e cálcio para produzir trombina, e esta sequência inicia a reação de coagulação (MUÑIZ et al., 2017).

Portanto, desenvolver um dispositivo que utilize esse componente natural do corpo humano, como princípio ativo encapsulado em membranas nanofibrosas poliméricas, pode representar um marco na medicina, uma vez que possibilitaria o uso doméstico e de fácil manuseio e aplicação. Deste modo, se constitui numa nova modalidade de terapia que auxilia os profissionais da saúde a vencerem os desafios no intuito de recuperar lesões cutâneas de difícil cicatrização (PEREIRA; BACHION, 2008). Trabalhos utilizando a trombina com fins de auxiliar no processo de cicatrização foram publicados nos últimos anos, entretanto nenhum deles fazendo uso do processo de eletrofiação (GUGERELL et al., 2014; SHI et al., 2020; WANG et al., 2020a; XIE et al., 2013; XU et al., 2020; ZIV-POLAT et al., 2010).

Essa proteína resulta da clivagem proteolítica da protrombina e que, numa definição mais simples, se constitui numa enzima do plasma sanguíneo que catalisa a conversão de fibrinogênio à fibrina, a última etapa do processo de coagulação do sangue, e tem elencada em suas funções a ação procoagulante, protrombótica e sinalizadora (MARAGOUDAKIS; TSOPANOGLOU, 2009; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Além disso, possui uma proporção excepcionalmente grande de resíduos carregados, na qual cargas negativas e positivas dos resíduos não são distribuídas uniformemente por toda a molécula, mas são agrupados para formar um potencial eletrostático (BODE; TURK; KARSHIKOV, 1992).

Estes grupos carregados da trombina, por sua vez, dão origem às forças eletrostáticas bastante altas ao redor da molécula de trombina, podendo favorecer uma interação eletrostática com outras estruturas, como por exemplo, a heparina (BODE; TURK; KARSHIKOV, 1992).

Essa característica pode ser utilizada no desenvolvimento de membranas de biopolímeros, carreadoras de trombina, com o intuito de controlar a sua liberação no local desejado pela atração eletrostática desta com a matriz polimérica, possivelmente a partir de interações do tipo ligações de hidrogênio, como descrito na literatura (BURRIDGE et al., 2020).

De acordo com a literatura a difusão do medicamento é proporcional à espessura do dispositivo, e que ao passar de macro para micro e para materiais nano-dimensionados, as taxas de liberação de medicamentos mudam para perfis que são rápidos demais para serem terapeuticamente benéficos (SILL; VON RECUM, 2015). Sendo assim, através de uma interação mais forte entre polímero/princípio ativo, pode-se diminuir esse efeito da rápida difusão nos sistemas de liberação controlada com materiais nanoestruturados, fazendo com que este se comporte de maneira mais eficiente.

Com base no exposto, esse trabalho teve como objetivo a incorporação de trombina em uma matriz polimérica nanoestruturada biocompatível, para criação de um dispositivo tão ou mais eficientes que os existentes no mercado, que disponibilize a trombina no local a ser recuperado. O sucesso desta incorporação permite aumentar a oferta de curativos na rede pública de saúde e no mercado em geral, uma vez que esses dispositivos possuem grande potencial para o tratamento de lesões cutâneas, crônicas ou não, oriundas de outras doenças ou adquiridas por cirurgias, disponibilizando a trombina de forma simples no local desejado, acelerando o processo de cicatrização, prevenindo hemorragias, evitando a infecção e diminuindo o tempo de recuperação dos pacientes.

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e caracterização físico-química e biológica de membranas de poli (óxido de etileno) (PEO) eletrofiadas, contendo trombina como princípio ativo, verificando seu efeito na cicatrização de lesões teciduais.

2.1. Objetivos Específicos

 Preparar e caracterizar soluções poliméricas de poli (óxido de etileno) -PEO, quanto à viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial na fase da pré-eletrofiação.

2. Preparar e caracterizar membranas eletrofiadas das soluções de PEO, estabelecendo a relação entre a morfologia da membrana obtida com as características das soluções e com os parâmetros do processo.

3. Selecionar os melhores parâmetros de obtenção de membranas, com diâmetros de fibras dentro do desejado, e produzi-las com adição de soluções de trombina em diferentes concentrações.

4. Caracterização físico-química das membranas obtidas nos itens 2 e 3, por MEV, DMA, FT-IR, RMN – Dosy e Dicroísmo Circular, para observar possíveis alterações da estrutura da membrana e da trombina, assim como sua presença, após o processo de eletrofiação.

5. Realizar análise em UV-Vis para avaliar a atividade da trombina na membrana após o processo de eletrofiação.

6. Caracterização biológica - realizar testes citotoxicológicos (MTT e *Live/Dead*), migração celular *in vitro* (*Scratch Assay*) e de cicatrização *in vivo*,

seguindo o Guia Internacional de Biodiversidade e Experimentação Animal (CIOMS, 1985).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Eletrofiação (ELECTROSPINNING)

A eletrofiação é uma técnica simples, que permite a produção de fibras com diâmetros na ordem de 10 microns a 10 nm, pela aceleração de um jato de uma solução carregada sob a influência de um campo elétrico. Esta técnica tem chamado à atenção devido à facilidade de se obter fibras nanométricas, tanto de polímeros naturais como sintéticos. Aplicações potenciais para estas fibras incluem a área de filtração, de catálise, de liberação de drogas, de engenharia de tecidos, dentre outras igualmente importantes (FRIDRIKH et al., 2003).

Este processo utiliza uma fonte de alta voltagem que polariza as cadeias na solução polimérica ou no polímero fundido, pela ação de um campo elétrico aplicado, acelerando o trajeto do polímero até um coletor de polaridade oposta à da solução (figura 1). À medida que aumenta a atração eletrostática entre as cargas opostas do líquido e do coletor e que a repulsão eletrostática entre as cargas no líquido se tornam mais fortes, o fio da solução que sai da seringa muda de um menisco arredondado para um formato aproximado de cone, denominado cone de Taylor (SILL; VON RECUM, 2008).

Figura 1 - Equipamento de eletrofiação.



Fonte: SILL; VON RECUM (2015)

Quando a tensão aplicada é alta o suficiente para superar as forças da superfície que atuam no cone de Taylor, um jato estreito de líquido é gerado a partir deste e viaja em direção ao coletor. Um eletrodo de polaridade oposta ou carga neutra (aterrada) é localizado nas proximidades para atrair e coletar as fibras. À medida que o jato líquido viaja pelo ambiente em direção ao coletor, o solvente do jato evapora e uma fibra sólida é depositada (HASAN et al., 2014).

Atualmente, a técnica é considerada um método bastante simples e versátil para a obtenção de membranas (figura 2) constituídas de fibras poliméricas, de alta funcionalidade e alto desempenho, que podem revolucionar o campo dos materiais estruturados com amplo campo de atuação, apesar de ainda não ser possível quantificar a área disponível das nanofibras, por não termos tecnologia para isso no momento.



Figura 2 - Membrana obtida pelo processo de eletrofiação.

Fonte: A autora

Entretanto, ressalta-se que uma grande quantidade de parâmetros associados à solução (viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial), ao polímero (massa molar e interação entre este e o solvente), ao processo (como campo elétrico aplicado, distância entre agulha e coletor, vazão da solução e velocidade do coletor, em caso de coletor rotativo) e ao ambiente (umidade e temperatura) pode influenciar nas propriedades das fibras obtidas (COSTA et al., 2012a).

Sill e Von Recum (2015) descreveram relações entre alguns parâmetros do processo e a morfologia das fibras obtidas. Segundo a pesquisa, o aumento da vazão da solução e da concentração do polímero na solução (que se relaciona com a viscosidade) proporciona o aumento do diâmetro da fibra, com potencial ocorrência de contas na estrutura. O aumento da tensão, da distância entre agulha e anteparo e da condutividade elétrica da solução, fazem com que o diâmetro das fibras diminua. E ainda, com o uso de solventes mais voláteis, são obtidas fibras com microtexturas, o que possibilita um aumento da superfície de contato do material (SILL; VON RECUM, 2015).

É importante destacar que a relação exata entre parâmetros e morfologias será diferente para cada sistema, e que dependendo do número de parâmetros analisados, resultados diferentes podem ser obtidos, mesmo usando o mesmo polímero e equipamento. Devido aos vários entraves para o sucesso do processo de eletrofiação, torna-se extremamente necessário o estudo dos parâmetros envolvidos, para se alcançar fibras com as características desejadas, de acordo com o objetivo pretendido.

Quando se fala desta técnica, muito se discute sobre o potencial de aplicação das nanofibras, que podem ser utilizadas em diversas áreas, desde a bioengenharia até a engenharia eletrônica. Tal potencial impulsionou nos últimos anos um crescimento exponencial de pesquisas na área de engenharia de tecidos e liberação controlada de medicamentos (SILL; VON RECUM, 2015). Evidência disso vem do grande número de trabalhos publicados nessa área, devido à semelhança desses materiais com os tecidos humanos (WEBBER et al., 2012), podendo apresentar a mesma ordem dimensional dos materiais biológicos (SILL; VON RECUM, 2015). Deste modo, tais materiais possuem características que os tornam propícios ao uso como biomaterial.

Como exemplo de pesquisas que utilizaram a técnica de eletrofiação, pode-se citar a de Mahoney e equipe que prepararam *scaffolds* de nanofibras de poli (caprolactona)/quitosana para regeneração de tecido traqueal, obtendo um material que exibiram uniformidade, integridade estrutural, propriedades mecânicas adequadas e compatibilidade celular (MAHONEY et al., 2016).

Outras pesquisas, como de Gautam, Dina e Mishra, eletrofiaram compósitos de poli (caprolactona)/gelatina para uso na engenharia de tecidos, como *scaffolds*. As interações obtidas entre poli (caprolactona) e gelatina se

mostraram benéficas para a adesão e proliferação celular, ratificando o uso como biomaterial (GAUTAM; DINDA; MISHRA, 2013).

Santos e colaboradores desenvolveram curativo nanoestruturado de poli (ácido lático) com o fitoterápico *Sedum dendroideum* para aplicação na cicatrização de pele em ratos *Wistar*, apresentando, no teste *in vivo*, um significativo aumento de células inflamatórias, fibroblastos, fibras colágenas e espessura do epitélio, comprovando a eficácia do material na cicatrização de feridas (SANTOS et al., 2013).

Scaffolds eletrofiados com quitosana, hidroxiapatita e genipin foram desenvolvidos para uso como matriz extracelular óssea por Fronhbergh e colaboradores, que obtiveram uma membrana com boas propriedades mecânicas, sendo potenciais candidatos ao uso na engenharia de tecidos ósseos para reconstrução craniana e maxilo - facial (FROHBERGH et al., 2012).

Também na área de biomateriais, Nista, Bettini e Mei desenvolveram membranas com estrutura *core-shell*, com propriedades muco adesivas de quitosana e alginato, com potencial aplicação em liberação controlada de medicamentos, para uso tópico em gengiva (NISTA; BETTINI; MEI, 2015).

As pesquisas citadas, dentre tantas outras que fizeram e fazem uso da técnica, mostram que existe viabilidade deste processo no desenvolvimento de novos materiais com aplicabilidade na área da saúde, corroborando com a escolha da eletrofiação para desenvolver membranas com características anti-hemorrágicas e cicatrizantes como neste trabalho de pesquisa.

3.2. Poli (Óxido de Etileno) – PEO

O poli (óxido de etileno) – PEO – é um homopolímero de baixo custo, termoplástico, produzido pela polimerização heterogênea do óxido de etileno. Por ser solúvel em água e biocompatível, PEO tem sido usado em muitos materiais compósitos e nanocompósitos, hidrogéis e sistemas de liberação controlada (NETO; FONSECA; PEREIRA, 2015; WANG et al., 2013b). Trata-se de um polímero com um só tipo de monômero (óxido de etileno, figura 3), denominado homopolímero, com caráter não iônico e representado pela fórmula: (OCH₂CH₂) (ISRAELACHVILI, 1997).

Figura 3 - Fórmula estrutural do monômero do polímero poli (óxido de etileno).



Fonte: A autora

Nas últimas décadas, cientistas têm investigado sobre as muitas propriedades físicas deste polímero, por possibilitar aplicações diversas em inúmeras áreas, tais como adesivos para próteses dentárias, películas para embalagens, espessamento de tintas à base de água, redução de atrito, purificação de materiais biológicos e medicamentos (BURGAZ, 2011). Esse composto é biocompatível, incolor, inodoro, límpido e inerte para muitos agentes químicos (ALCANTAR; AYDIL; ISRAELACHVILI, 2000).
O poli (óxido de etileno) é o polímero solúvel em água mais comum e também miscível neste solvente em todas as proporções à temperatura ambiente; entretanto, em temperaturas elevadas (> 98º C) sua solubilidade diminui (NETO; FONSECA; PEREIRA, 2015). Esta característica faz com que seu emprego como biomaterial seja usual, pois melhora o potencial de biocompatibilidade e evita o uso de solventes orgânicos, tóxicos para a exposição de células, *in vitro* ou *in vivo* (JIN et al., 2002).

Por ser bioadesivo, ou seja, capaz de se ligar a substratos biológicos (muco e citoadesivos), este polímero se torna bastante útil para aplicação em liberação controlada, ou outras formas inovadoras de administração de medicamentos (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

A eletrofiação é uma das formas de se produzir dispositivos para liberação controlada, e o PEO conquistou sua popularidade com ela, tendo diversos artigos publicados desde o ano de 1995. Por ser um polímero altamente eletrofiável, ele foi inclusive utilizado para o desenvolvimento dos equipamentos desta técnica em diversos outros estudos (DEITZEL et al., 2001; DOSHI; RENEKER, 1995). Podendo ser aplicado sozinho ou em conjunto com outros polímeros e/ou materiais, para o desenvolvimento de biomateriais (BURGAZ, 2011; FROHBERGH et al., 2012; HUANG et al., 2003; JIN et al., 2002; LI; YANG, 2020; WANG et al., 2013b; ZARGHAMI et al., 2015).

O PEO é utilizado com frequência em compósitos para melhorar as propriedades de outros polímeros. Um dos exemplos é o trabalho de Zarghami e colaboradores, que produziram compósitos de quitosana/PEO/PCL/óleo de oliva. Neste trabalho, o PEO foi utilizado para melhorar as propriedades

37

mecânicas da quitosana, para aplicação como *scaffolds* no recobrimento de feridas (ZARGHAMI et al., 2015).

Com a intenção de melhorar as condições de processamento na produção de membranas eletrofiadas e para melhorar a biocompatibilidade do material desenvolvido, Jin e colaboradores prepararam blendas de fibroína/PEO, obtendo com sucesso nanofibras através do processo de eletrofiação (JIN et al., 2002).

Nanocompósitos de PEO/argila/sílica foram preparados para o estudo das propriedades termomecânicas e morfológicas do material para aplicação em baterias recarregáveis de lítio, com melhoras nas características estudadas (BURGAZ, 2011).

Devido a sua gama de boas propriedades mostradas nos diversos estudos publicados até os dias de hoje, o PEO se mostra uma excelente opção para o desenvolvimento de biomateriais nanoestruturados e formas inovadoras de administração de medicamentos, que podem ser uma alternativa às terapias convencionais de tratamento utilizadas na medicina.

3.3. Trombina

A trombina, proteína fundamental no processo de coagulação, é responsável por manter e estabilizar a rede de fibrina que reforça os tampões hemostáticos. Assim, enquanto a capacidade de formar agregados de plaquetas é o fator fundamental para o início da hemostasia, a habilidade para gerar trombina pelos mecanismos intrínseco e extrínseco da coagulação do

sangue é a chave necessária para as etapas posteriores da hemostasia (FENTON; FASCO; STACKROW, 1977).

A molécula de trombina se constitui numa serina protease da família da quimotripsina, que inclui enzimas envolvidas nos processos de digestão e degradação, coagulação sanguínea, imunidade mediada por células e morte celular, fibrinólise, fertilização e desenvolvimento embrionário, e apresenta um tempo de meia vida de 15 s no plasma humano, devido ao controle rigoroso dos inibidores (ZIV-POLAT et al., 2010).

Sua precursora, a protrombina, é produzida no fígado e liberada no plasma, que permanecerá circulando na corrente sanguínea até que seja convertida em trombina madura na cascata de coagulação (KRENZLIN et al., 2016). Uma vez então gerada no sangue, a trombina desempenha duas funções importantes e paradoxalmente opostas (DI CERA, 2008; FENTON; FASCO; STACKROW, 1977).

Atua como um fator pró coagulante quando converte o fibrinogênio em um coágulo insolúvel de fibrina, que ancora as plaquetas no local da lesão e inicia processos de reparo de feridas. Essa ação é reforçada e amplificada pela ativação do fator XIII da transglutaminase, que estabiliza covalentemente o coágulo de fibrina, a inibição da fibrinólise e a ativação proteolítica dos fatores V, VIII e XI (CERA, 2003).

Por outro lado, atua como anticoagulante através da ativação da proteína C. Essa função se desenvolve *in vivo* após a ligação à trombomodulina, um receptor na membrana das células endoteliais. O sequestro de trombina por trombomodulina e a ativação da proteína C na microcirculação, constituem a via anticoagulante natural que impede a

conversão intravascular maciça de fibrinogênio em um coágulo insolúvel na geração de trombina (CERA, 2003).

A eficiência da cascata de coagulação depende do equilíbrio entre essas duas vias: pró coagulante e anticoagulante. Sendo assim, a trombina é o árbitro principal desse equilíbrio em virtude de seu duplo papel e, portanto, recebeu muita atenção como agente de terapias anticoagulante (DI CERA, 2008).

Além de desempenhar um papel central na trombose e hemostasia, a trombina também atua em outras funções, como levar respostas inflamatórias, proliferação/modulação celular, proteção celular e apoptose. É capaz de ativar vários fatores de coagulação e do plasma, exibe reatividade em relação à proteína C (importante na função anticoagulante), induz a agregação e estimula a secreção plaquetária, causandomitogênese em fibroblastos e células semelhantes a macrófagos. Ademais, atua como uma molécula de sinalização polifuncional que se liga a vários substratos com uma ampla diversidade estrutural (BERLINER, 1992; KRENZLIN et al., 2016).

A trombina apresenta estrutura quaternária (figura 4) e é composta por duas cadeias polipeptídicas, que são ligadas covalentemente através de uma ligação dissulfeto. A cadeia menor é composta por 36 resíduos e normalmente denominada cadeia A ou L (*light*). A cadeia maior com 259 resíduos é denominada cadeia B ou H (*heavy*). A cadeia A fica localizada no hemisfério oposto de onde está localizado o sítio ativo. Este fica localizado na cadeia B e é caracterizado por uma cavidade no centro da molécula. A cadeia A é rica em resíduos carregados que fazem interações polares com parceiros da cadeia B (DI CERA, 2007).

40



Figura 4 - Ilustração da fita da cadeia polipeptídica da trombina humana.

Fonte: BERLINER (1992)

Sua estrutura possui um número excepcionalmente grande de resíduos com cargas, em comparação com as enzimas pancreáticas. As cadeias A e B contêm 9 e 31 resíduos ácidos e 6 e 37 resíduos básicos, respectivamente. Em alguns locais da superfície da trombina, grupos químicos carregados e desigualmente distribuídos são responsáveis por aglomerados de cargas positivas e negativas, que dão origem a altas forças de campo eletrostático ao redor da superfície da trombina. Esse agrupamento de cargas é a razão da forte interação eletrostática da trombina com estruturas aniônicas (figura 5), mesmo em valores fisiológicos de pH, onde sua carga geral é quase nula (BODE; TURK; KARSHIKOV, 1992).

Figura 5 - Desenho esquemático das interações iônicas dentro da cadeia A da trombina e entre a cadeia A da trombina (conexões em negrito) e a cadeia B (conexões duplas).



Fonte: BODE; TURK; KARSHIKOV (1992)

É de conhecimento que a trombina atua no fibrinogênio para formar fibrina, exercendo um efeito de coagulação do sangue, sendo esse o motivo de ser usada clinicamente como agente hemostático para aplicação tópica no campo da cirurgia. Entretanto, devido a sua instabilidade em solução aquosa, geralmente é transformada em preparação médica liofilizada, e a dissolução é feita apenas no momento da cirurgia, logo antes de ser aplicada (HIDEO NISHIMAKI et al., 1992).

Visto as características e importância da trombina no processo de coagulação e cicatrização, além dos inúmeros estudos já desenvolvidos para desvendar tais funções, novos estudos vêm sendo realizados para conseguir desenvolver maneiras de utilizá-la de forma tópica, para auxiliar na cicatrização

de feridas (CRESTE et al., 2020; DOS SANTOS et al., 2016; HUANG et al., 2015).

Ziv-Polat e colaboradores examinaram a eficiência da trombina ligada a nanopartículas de maghemita, um membro da família dos óxidos de ferro, para aplicação na cicatrização de feridas em comparação com a trombina livre. Para tanto, trataram as feridas com fibrinogênio, CaCl₂ e trombina, ligada e livre; fecharam as feridas com grampos e as observaram ao longo de 28 dias. Como resultado, obtiveram maior resistência com relação à tração da pele e estágios mais avançados da cicatrização, nas feridas tratadas com trombina ligada, quando comparada ao controle (ZIV-POLAT et al., 2010).

Gugerel e colaboradores compararam as biomatrizes de fibrina encontradas no mercado com diferentes concentrações de trombina, para identificar a relação da concentração com a cicatrização excisional de ratos. Em biomatrizes com altas concentrações de trombina (800 – 1200 UI/mL) foi observada uma deterioração da compatibilidade celular, um menor número de vasos sanguíneos e menores quantidades do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Por sua vez, nas biomatrizes com menor quantidade de trombina (4 UI/mL), foram observados um fechamento mais rápido e feridas com menor grau de severidade (GUGERELL et al., 2014).

O estudo da eficácia de um selante hemostático durante o controle do sangramento causado por trauma hepático em cães foi realizado por Xie e equipe baseado na formação de gelatina *in situ* catalisada por trombina e reticulada por transglutaminase. Para isso, foram lesionados fígados de cães e as feridas foram tratadas por 10 dias com selante tópico. Como resultado, foi observado que a hemostasia, e consequentemente a perda de sangue, foi

significativamente menor nos grupos tratados com o selante. As lesões se tornaram significativamente menores no 3º dia de tratamento, com fechamento no 7º dia, ao passo que as lesões controle permaneciam abertas ao final do 10º dia de estudo. Isso mostrou que o material desenvolvido com trombina apresentou uma eficiência muito melhor na hemostasia e cicatrização de feridas (XIE et al., 2013).

Outro grupo, Huang e colaboradores, desenvolveu um curativo hemostático para hemorragia, baseado numa esponja de quitosana revestida por filmes auto montados de trombina e ácido tânico, envolvendo interações do tipo ligações de Hidrogênio entre essas substâncias em pH fisiológico. Os resultados obtidos mostraram que a quitosana revestida apresentou uma taxa significativamente maior de coagulação, com a meia vida da trombina imobilizada 8,5 vezes maior que a da trombina livre. A partir desses resultados este material demonstrou ser um candidato a ser utilizado como curativo em hemorragias descontroladas (HUANG et al., 2015).

Os exemplos aqui relacionados foram os poucos trabalhos, encontrados na literatura, que fizeram uso da trombina como princípio ativo, associada a outro material biológico ou não, no estudo de cicatrização tecidual. Diante de tal fato, torna-se necessário aprofundar e ampliar as pesquisas para o desenvolvimento de novos materiais associados à trombina, com fins cicatrizantes, como alternativa viável para cicatrização de feridas de várias naturezas, como o caso daquelas de difícil cicatrização como será abordado a seguir.

44

3.4. Lesões na Pele e Processos de Cicatrização

Quando qualquer região da pele sofre algum tipo de lesão, o tecido irá se recuperar através de proliferação e crescimento de células da derme (fibroblastos e outras células estromatosas) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos) remanescente (JANSSON; HAEGERSTRAND; KRATZ, 2001).

As lesões de pele são classificadas em feridas sem perda de tecido (como as decorrentes de cirurgias) e com perda de tecido (queimaduras, abrasões e úlceras resultantes de traumas ou de doenças crônicas). São também classificadas pelas camadas envolvidas (figura 6): feridas superficiais atingem a derme, feridas profundas parciais atingem o tecido subcutâneo (hipoderme), e feridas profundas totais atingem os músculos e as suas estruturas adjacentes (PAUL; SHARMA, 2004).





Fonte: (A) (BONIFANT; HOLLOWAY, 2019) (B) A autora

Durante o processo de cicatrização tecidual, diferentes fases simultâneas atuam de forma a reestruturar o local afetado. É um processo

complexo e engloba a organização das células, sinais químicos e matriz extracelular para reparar o tecido (FERREIRA et al., 2010).

É entendido por matriz extracelular o conjunto de macromoléculas, proteínas e polissacarídeos, localizados entre as células de um determinado tecido ou no lado externo da membrana plasmática de qualquer célula, considerada isoladamente. Esses componentes são geralmente produzidos pelas mesmas células ou fornecidos pela corrente sanguínea. Nos dois casos, eles se organizam numa espécie de rede e ocupam o espaço entre as células, formando o meio em que elas sobrevivem, se multiplicam e desempenham suas funções (ARENAS; DE ZURBARÁN, 2002).

Do processo de cicatrização, a hemostasia, primeira das fases, começa imediatamente após o ferimento, com constrição vascular e formação de coágulos de fibrina (GUO; DIPIETRO, 2010). Consiste de quatro fases altamente integradas e sobrepostas: (a) iniciação, (b) amplificação, (c) propagação e (d) finalização, na qual diversas proteínas circulantes do sangue, atuando como enzimas, normalmente inativas, são tratadas como fatores de coagulação.

Todo o processo desencadeado por estes fatores de coagulação depende da ativação de um fator para ativação do seguinte, por isso, este processo foi denominado de cascata da coagulação, ou em uma definição mais atual, modelo da coagulação baseado em superfícies celulares (FERREIRA et al., 2010).

O objetivo final de todas as ativações dos fatores é a transformação do fibrinogênio em fibrina, com a formação de uma rede e consolidação do plug plaquetário em um coágulo de caráter mais duradouro. Os fatores de

coagulação foram denominados através da utilização de números romanos, indicadores da ordem na qual foram descobertos. As fases e suas funções biofisiológicas (figura 7) devem ocorrer na sequência adequada e continuar por um período específico em uma intensidade ideal (GUO; DIPIETRO, 2010).





Fonte: FERREIRA et al. (2010)

A fase de iniciação (a) ocorre quando células que expressam o fator tecidual (FT) em sua superfície são expostas aos componentes do sangue na região da lesão. Em uma sequência de ativações de diferentes fatores, como mostrado na figura 7, o FT forma um complexo com o fator VII, que ativa os fatores X e V. Estes nas suas formas ativas formam um outro complexo, FXa/FVa, que é denominado protrombinase. Este complexo FXa/FVa, por sua vez, é responsável por ativar pequenas quantidades do fator II, ou seja, transformar protrombina (FII) em trombina (FIIa), proteína esta de demasiada importância ao longo de todo o processo de coagulação (FERREIRA et al., 2010).

Na fase (b) amplificação, as plaquetas que escaparam de dentro do vaso se ligam ao colágeno e outros componentes da matriz extracelular, onde serão parcialmente ativadas, formando então um tampão plaquetário. Neste momento, pequenas quantidades de trombina podem interagir com as plaquetas, iniciando o processo hemostático (FERREIRA et al., 2010; GUO; DIPIETRO, 2010).

Logo em seguida se inicia a fase (c) de propagação, responsável por atrair uma grande quantidade de plaquetas para a lesão e pela produção do complexo FIXa/FVIIIa, denominado tenase, que será responsável por ativar o fator X. Tal fator formará mais uma vez o complexo FXa/FVa, ou protrombinase, responsável agora por converter grande quantidade de protrombina em trombina. Neste momento do processo, a trombina, em mais uma de suas funções em toda a cascata, irá quebrar o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário inicial (FERREIRA et al., 2010).

Finalmente, a fase de finalização (d) é responsável pela formação do coágulo sobre a área da lesão. Para evitar obstrução trombótica do vaso, o processo deve se limitar à região lesionada; sendo assim, faz-se necessário o

controle da coagulação, e é nesta fase que aparecem quatro anticoagulantes naturais: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), que atua inibindo FT, FVIIIa e FXa; duas proteínas C (PC) e S (S) que inativam FVa e FVIIIa; e por fim a antitrombina (AT), que inibe a atividade da trombina e outros fatores, FIXa, FXa, FXIa e FXIIa (FERREIRA et al., 2010).

Em continuação à cicatrização, forma-se a fase inflamatória e grânulos de plaquetas são liberados, contendo diversos tipos de fatores de crescimento, que atraem neutrófilos para a área da ferida. Os neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na defesa antibacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos. Estes, por sua vez, terminam o desbridamento, secretam citocina e fatores de crescimento, contribuem para a angiogênese, fibroplasia e síntese da matriz extracelular, fundamentais na transição para a próxima fase (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; GUO; DIPIETRO, 2010; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

A fase seguinte se sobrepõe à fase inflamatória e é caracterizada pela proliferação e migração epitelial sobre a matriz provisória dentro da ferida. É constituída por quatro fases fundamentais: (a) epitelização, (b) angiogênese, (c) formação do tecido de granulação e (d) deposição do colágeno. Durante a epitelização, células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de reestabelecer uma barreira protetora (GUO; DIPIETRO, 2010).

Logo em seguida, a angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF – α), esta fase é caracterizada pela migração de células endoteliais e a formação de capilares, essenciais para uma cicatrização adequada. Na formação de tecido de granulação, os fibroblastos migram para a ferida, precisando ser ativados, sendo o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) o mais importante para esta função. Por fim, é liberado fator de crescimento beta (TGF – β), que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I, transformando-se em miofibroblastos, que promoverão a contração da ferida (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; DARBY et al., 2014; GUO; DIPIETRO, 2010).

Na última fase do processo de cicatrização, ocorre o remodelamento, com a deposição do colágeno de maneira organizada. O colágeno inicial, mais fino, é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido organizadamente, onde haverá um aumento da resistência da ferida e a reorganização da nova matriz extracelular, na qual fibroblastos e leucócitos secretarão colagenase, que promoverá a quebra da matriz antiga. Os fibroblastos desempenham um papel crucial em todo o processo, uma vez que produzem a nova matriz extracelular necessária para suportar o crescimento celular, usando o colágeno como blocos de construção (AKBIK et al., 2014).

A cicatrização terá sucesso quando houver o equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a quebra da antiga. Ressalta-se que a organização do colágeno não será como o da pele sadia, mesmo após ter passado muito tempo do ferimento, assim como a resistência do tecido (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

Após toda essa série de fases e processos, subentende-se que interrupções, alterações ou prolongamento de parte do processo ou do processo como um todo (figura 8), podem levar a um atraso na cicatrização de feridas ou a uma ferida crônica que não cicatriza. Por isso, investigações laboratoriais e estudos clínicos produziram uma riqueza de informações sobre

50

a cicatrização normal e prejudicada das feridas, encontrada em um grande número de artigos publicados (AKBIK et al., 2014; DARBY et al., 2014; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014; ZHAO et al., 2017).



Figura 8 - As quatro fases da cicatrização aguda de feridas.

```
Fonte: AKBIK et al. (2014)
```

Embora ainda haja muito a ser pesquisado e entendido, os estudos desta área podem levar a terapias que promovam o reparo adequado dos tecidos e melhoram a cicatrização prejudicada, consequentemente melhorando a qualidade de vida de pacientes que sofrem com algum tipo de problema no processo cicatricial (GUO; DIPIETRO, 2010).

3.5. Feridas de Difícil Cicatrização

O microambiente de uma ferida cicatrizante é complexo e envolve um grande número de moléculas, como já tratado anteriormente. A partir deste ponto, sabe-se que feridas crônicas não cicatrizantes, como úlceras em pés diabéticos, úlceras de pressão e úlceras venosas das pernas, feridas agudas atrasadas e feridas crônicas e as associadas à isquemia e diabetes *mellitus*, exibem um processo de cicatrização patologicamente retardado. Assim, elas permanecem abertas ou parcialmente cicatrizadas por várias semanas ou meses, podendo entrar em um estado de inflamação patológica (ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014).

Esse tipo de problema é caracterizado pela presença de estímulos inflamatórios persistentes, que interrompem os mecanismos fisiológicos de cicatrização, causando atração contínua de macrófagos e neutrófilos para o leito da ferida, com a secreção de citocinas inflamatórias. Estas, por sua vez, aumentam a produção de metaloproteinases, que interrompem o processo cicatricial (GUO; DIPIETRO, 2010). Além disso, as feridas podem ser contaminadas por uma população de diferentes bactérias e de diversas fontes. Nessas situações, a resposta da imunidade, diante da presença de bactérias, prolonga ainda mais a inflamação dos tecidos, retardando mais o processo de cicatrização (ABRIGO; MCARTHUR; KINGSHOTT, 2014).

Existem muitos fatores que podem afetar a cicatrização e que interferem em uma ou mais fases do processo. Esses fatores podem ser locais, quando influenciam diretamente as características da própria ferida, como falta de oxigenação, infecção, algum corpo estranho ou insuficiência venosa. Também podem ser sistêmicos, quando o estado geral de saúde ou doença do indivíduo afeta sua capacidade de curar, como a idade, o sexo, o estresse, a isquemia, doenças (diabetes, quelóide, fibrose, distúrbios hereditários de cura, icterícia, uremia), obesidade, medicamentos (esteróides glicocorticóides, antiinflamatórios não esteróides, quimioterapia), o alcoolismo e o tabagismo, condições imunocomprometidas (câncer, radioterapia, AIDS) e nutrição (GUO; DIPIETRO, 2010).

Muitos desses fatores estão relacionados, e os fatores sistêmicos agem através dos efeitos locais que afetam a cicatrização. De forma geral, nessas situações, a macro e a microcirculação da pele são afetadas, conduzindo à interrupção na nutrição das suas camadas, tornando-se cada vez mais isquêmica e hipóxia. Como consequência, as células da pele morrem e dão origem ao tecido necrótico, sendo que em muitas feridas crônicas, o tratamento eficaz das causas subjacentes vem a ser tão importante quanto o tratamento local da ferida (CAVAZANA et al., 2007).

Os números específicos sobre as feridas não cicatrizadas, mostram que cerca de 3 a 6 milhões de pessoas são afetadas nos Estados Unidos com esse tipo de problema, com 85% dos eventos ocorrendo com pessoas na faixa etária de 65 anos ou mais. As feridas que não cicatrizam resultam em enormes gastos com assistência médica, com um custo total estimado em mais de US\$ 3 bilhões por ano (GUO; DIPIETRO, 2010).

No Brasil os registros de usuários acometidos por alterações na pele são deficientes. De acordo com um levantamento realizado junto ao Ministério da Saúde quase 2,3 milhões de pessoas foram internadas em decorrência de doenças de pele e do tecido subcutâneo, entre os anos de 2009 e 2018, o que gerou um custo de quase R\$ 975 milhões nesse período (BARBOSA; LIMA, 2019).

Com base no exposto, mostra-se importante o desenvolvimento de novos tratamentos mais avançados, capazes de reduzir a carga bacteriana e melhorar o gerenciamento de feridas de forma efetiva. Alternativas interessantes têm surgido e se mostrado promissoras, logo esta pesquisa vem ao encontro a essa realidade, tendo como objetivo principal, desenvolver um novo dispositivo, capaz de acelerar o processo de cicatrização de lesões cutâneas, com boas propriedades físicas, químicas e biológicas e que propicie o crescimento celular esperado, para ser usado como *scaffolds* no recobrimento de feridas, diminuindo o tempo de cicatrização de lesões teciduais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados: Poli (óxido etileno) – PEO (massa molar: 900000 g/mol), disponível no laboratório e descrito na literatura para produção de nanofibras com essa ordem de massa molar (JIN et al., 2002), Sigma-Aldrich, em grau analítico, água deionizada, trombina humana 250 UI/mL liofilizada com grau de pureza ≥ 95% (massa molar: 37 kDa), Sigma – Aldrich (SRP6557). As soluções de trombina utilizadas foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, e posteriormente, as diluições foram preparadas para alcançar as concentrações desejadas.

Figura 9 - Esquema do processo de eletrofiação das nanofibras de PEO com trombina.



Fonte: A autora

Para o desenvolvimento das nanofibras utilizou-se a técnica de eletrofiação (figura 9), onde os constituintes utilizados foram uma seringa de vidro com agulha metálica, uma fonte de alta tensão, bomba de controle de vazão da marca *KdScientific*, modelo 100 conectada à seringa, e uma placa

coletora de cobre, recoberta com papel alumínio. Tal equipamento foi desenvolvido no laboratório de Biomateriais da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, por ex-alunos da prof.^a. Lucia Mei e com verbas de projetos FAPESP/CNPq Universal.

4.1. Processo de fabricação das membranas com e sem trombina

As membranas com aproximadamente 10 cm de diâmetro foram desenvolvidas pelo processo de eletrofiação a partir de 5 mL de soluções de PEO, utilizando água deionizada como solvente. Foram submetidas ao processo, conforme metodologia descrita a seguir e já previamente ensaiada.

Soluções de PEO com concentrações: 2,5%, 4,5% e 6,5% (JIN et al., 2002) foram eletrofiadas em temperatura ambiente e umidade relativa (UR) < 40%, utilizando-se uma seringa de vidro de 10 mL, com uma agulha de aço inox de 4 cm de comprimento e 0,8 mm de diâmetro interno, com ponta reta. O polo positivo de uma fonte de alta tensão, projetada para trabalhar na faixa de 2 a 40 kV, foi conectado a agulha da seringa, enquanto o eletrodo terra foi utilizado para aterrar o coletor. A vazão foi controlada (0,5 mL/h, 1,0 mL/h, 1,5 mL/h e 2,0 mL/h (WANG et al., 2013)) por uma bomba de vazão, da marca KdScientific, modelo 100, conectada a seringa. A distância da agulha ao coletor foi de 15 cm e a tensão aplicada de 25 kV.

As amostras das membranas nanoestruturadas foram coletadas em folhas de papel alumínio, as quais revestiram o coletor durante os experimentos. A escolha da melhor condição do processo (tabela 1) foi baseada na avaliação do diâmetro das nanofibras (em termos de dimensão e homogeneidade), aspecto das membranas e ausência de defeitos com base na análise morfológica de imagens obtidas em microscópio eletrônico de varredura - MEV, utilizando-se o software Image J para mensurar os diâmetros das fibras.

Tabela 1 - Variação dos parâmetros analisados, concentração e vazão no processo de eletrofiação.

Concentração de PEO	Vazão (mL/h)
(% m/v)	
2,5	0,5
2,5	1,0
2,5	1,5
2,5	2,0
4,5	0,5
4,5	1,0
4,5	1,5
4,5	2,0
6,5	0,5
6,5	1,0
6,5	1,5
6,5	2,0

Para a obtenção das nanofibras nas condições desejadas, menor diâmetro de fibras e melhor organização das mesmas, foi selecionada para a adição de solução de trombina nas concentrações de 2 UI/mL; 4 UI/mL e 8 Ul/mL de atividade (GUGERELL et al., 2014). Foram produzidos 5 mL de solução de PEO e à elas adicionados 100 µL de trombina nas concentrações citadas acima, de acordo com a literatura (EVERLAND et al., 2013) que estabelece uma quantidade de trombina por área da membrana. O cálculo da área foi realizado por aproximação, a partir dos conhecimentos adquiridos ao longo da pesquisa sobre a dimensão das membranas obtidas com PEO, uma vez que pela técnica utilizada, não é possível obter membranas com dimensões conhecidas e pré-estabelecidas.

Para o preparo das soluções de PEO com trombina, as soluções destas foram descongeladas lentamente e deixadas à temperatura ambiente, para evitar que a trombina perdesse a atividade. Esse cuidado foi tomado, uma vez que a trombina é muito instável em solução aquosa, devendo evitar qualquer mudança brusca de temperatura, que a torne inativa (HUANG et al., 2015). Após descongeladas completamente, um volume de 100 µL de solução de trombina foi adicionado na solução já preparada de 4,5% de PEO, para então seguir para agitação até a completa homogeneização.

Após a produção das membranas com trombina, estas foram armazenadas em pequenos sacos porta amostras sob refrigeração.

4.2. Caracterização das soluções poliméricas com e sem trombina

Para a técnica de eletrofiação, conhecer os parâmetros da solução utilizada é de extrema relevância, uma vez que interferem diretamente na morfologia e geometria das nanofibras. Parâmetros como viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica estão relacionados com as propriedades físico-químicas dos polímeros, dos solventes e com as interações do tipo polímero-solvente (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015; COSTA et al., 2012a; NISTA; BETTINI; MEI, 2015). Todos os ensaios de caracterização das soluções foram realizados no Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

4.2.1. Viscosidade

Os testes foram realizados em todas as soluções das diferentes concentrações de PEO e de PEO/trombina, em triplicata, em temperatura de 25ºC em banho termostático. Para isso foi utilizado um reômetro da marca Brookfield, modelo DVIII.

4.2.2. Tensão superficial

A tensão superficial das soluções foi determinada a partir de um tensiômetro K6 da marca Kruss, utilizou-se do método do anel de Du Nouy, fazendo uso de um cilindro coaxial no sistema ISO/DIN. Os testes foram realizados em triplicata.

4.2.3. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das soluções foi realizada fazendo uso de um condutivímetro da Analion, modelo C708 plus. As análises foram realizadas em triplicata.

4.3. Caracterização físico-química das membranas com e sem trombina

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia de cada membrana foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram revestidas com ouro utilizando equipamento *Sputter Coater* EMITECH, modelo: K450 (Kent, Reino Unido), com uma espessura de camada estimada em 200 Å. As fotomicrografias foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura com detector de Energia Dispersiva de raios X, modelo: Leo 440i (MEV) e 6070 (EDS) (LEO *Electron Microscopy*/Oxford – Cambridge, Inglaterra). As análises foram realizadas no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração – LRAC da Faculdade de Engenharia Química na Unicamp.

Para obter imagens com maior magnitude as análises também foram realizadas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do CNPEM, cujo equipamento FEI Inspect 50 operou com voltagem de 20 kV.

A partir das imagens obtidas, foi utilizado o software Image J para dimensionar o diâmetro das fibras das membranas, onde um número mínimo de 100 fibras foram medidas e os dados foram submetidos à análise estatística utilizando ANOVA, com nível de significância de 5%.

4.3.2. Análise de grupamentos químicos por ATR - FTIR

A espectroscopia de infravermelho fornece informações diretas sobre o comportamento vibracional das moléculas de uma substância. A importância da

técnica está no fato de que cada substância possui um conjunto específico de picos e/ou bandas que a caracteriza.

Neste trabalho, esta técnica foi realizada com intuito de identificar a presença de trombina na membrana preparada por eletrofiação e estudar a interação dos grupos químicos da trombina e do PEO antes e após o processo de eletrofiação.

A análise foi realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração – LRAC, da Faculdade de Engenharia Química/ UNICAMP, em um espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR - FTIR) da marca *Thermo Scientific*, modelo Nicolet 6700. As medidas foram feitas no modo ATR (cristal de Germânio) utilizando o acessório SMART OMNI SAMPLER, na faixa de 4000-675 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹, SCAN de 32.

4.3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma das técnicas mais importantes de análise qualitativa de princípios ativos, é uma ferramenta de controle de qualidade de princípios ativos e excipientes em medicamentos, uma vez que pode fornecer informações quantitativas significativas simultaneamente às qualitativas (SANTOS; COLNAGO, 2013). Nesse sentido, a análise foi utilizada para detectar a presença de trombina nas membranas eletrofiadas, uma vez que o FTIR não foi capaz de fazê-lo.

Os espectros de RMN foram obtidos em um equipamento Agillent DD2 localizado no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Os resultados obtidos foram reportados em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano. Para realização da análise, ~20 mg de cada amostra de membrana, com e sem trombina, foram dissolvidos em 0,6 mL de D₂O. Os parâmetros para aquisição dos dados de ¹H RMN foram: janela e atraso de relaxamento de 1,5 s e frequência de 499,726 MHz.

4.3.4. Experimentos de difusão (DOSY)

A facilidade com que cada soluto se move em um solvente é chamada de coeficiente de difusão e apresenta informações importantes sobre a massa, o tamanho, a forma, a disposição e a organização das moléculas.

O experimento de difusão, ou DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*), é uma técnica de espectroscopia de RMN que resolve ressonâncias de acordo com os coeficientes de difusão dos analitos. Destaca-se por fornecer as informações de uma maneira facilmente analisada, possibilitando uma visão global dos tamanhos de partículas em uma amostra e a detecção de impurezas, ou seja, é capaz de determinar componentes de misturas complexas e de baixa molaridade, reduzindo assim os requisitos de concentração em pelo menos 100 vezes (REILE et al., 2017). Sendo assim, a análise RMN - DOSY foi realizada para identificar a presença de trombina e a interação entre as cadeias de PEO/trombina nas membranas, identificando a difusividade do conjunto PEO/Trombina em água e traçando um comparativo com a difusividade do polímero isolado.

Os experimentos de difusão foram realizados em um equipamento da marca Agillent DD2 localizado no LNBio/CNPEM, usando uma sonda de

gradiente triplo de ressonância de 5 mm capaz de gerar campo de força de 50 G.cm⁻¹. A medição dos coeficientes de difusão foi realizada utilizando a sequência de pulsos Dbppste, implementada no pacote Biopack do software VNMRJ. Os parâmetros para aquisição dos dados foram: retardo de difusão de 100 ms, comprimento de gradiente de difusão de 3,0 ms e retardo de estabilização gradiente de 0,5 ms. Todas as análises foram realizadas utilizando 10 mg de membrana, com e sem trombina, dissolvidos em 600 µL de D₂O a 298 K. O espectro DOSY foi analisado usando o software VNMRJ (versão 4.2B).

4.3.5. Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica bem estabelecida para o estudo de estruturas secundárias, dinâmica, vias dobráveis e interações de proteínas solúveis, em que a capacidade das moléculas em desviar a luz polarizada é medida em uma faixa de comprimentos de onda, a partir da observação do desvio da luz, por isso, é bastante utilizada no estudo de moléculas quirais (MILES; WALLACE, 2016).

O típico espectro de dicroísmo circular (figura 10) mostra a conformação das proteínas, seja α -hélice (em vermelho), β -folha (azul) ou sem estrutura definida (*random coil*) (verde), e a partir dele, é possível observar mudanças na estrutura secundária da proteína, de acordo com as condições ambientais ou pela interação com outras moléculas (MICSONAI et al., 2018).

Figura 10 – Espectro de dicroísmo circular típico.



Fonte: (MILES; WALLACE, 2016)

Os espectros foram obtidos no espectropolarímetro marca Jasco Modelo J-720, utilizando cubetas de 0,5 cm, no intervalo de 190 a 250 nm para UVdistante, a 25 °C. A análise foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

4.3.6. Ensaio Mecânico – DMA

É de conhecimento que um curativo ideal para feridas deva ser capaz de: (a) promover um ambiente úmido (b) fornecer proteção mecânica (c) não permitir a adesão à ferida (d) garantir proteção contra o calor (e) ser capaz de absorver o excesso de exsudado (f) permitir a troca gasosa e (g) não ser citotóxico para tecido. Portanto, um material ideal para fabricação de curativos, deve possuir resistência à tração, apresentando boas características viscoelásticas, para que o curativo não corra o risco de ser danificado pelo manuseio (POONGUZHALI; BASHA; KUMARI, 2018). Para identificar essas características foi realizada a análise dinâmicomecânica (DMA), em modo flexão em 3 pontos, das membranas, com e sem trombina, em equipamento Q800 da TA Instruments a 1 Hz e de -100 a 30°C com uma taxa de aquecimento de 3°C/min, para obter valores do módulo de armazenamento (E') e de temperatura de transição vítrea (Tg). As amostras foram cortadas em formato retangular de 1 x 3 cm, com espessura abaixo de 0,5 mm, e as análises foram realizadas em triplicata. Esta análise foi realizada no departamento de Engenharia de Materiais Poliméricos da Universidade de Lyon na França, com colaboração de aluno de doutorado da FEQ, Filipe V. Ferreira.

4.3.7. Estudo da atividade da Trombina (UV-Vis)

Partimos das concentrações iniciais de trombina, mas não foi possível quantificar sua quantidade exata nas membranas, apenas quantificar a manutenção da sua atividade, que foi feito nesta análise.

O estudo foi realizado para identificar se a atividade da trombina foi mantida após passar pelo processo de eletrofiação, uma vez que a trombina é muito instável em soluções aquosas (HIDEO NISHIMAKI et al., 1992), motivo pelo qual é sempre vendida liofilizada. Para ser inserida nas membranas, ela passou por descongelamento, mistura com a solução de PEO, para então ser eletrofiada, sob alta voltagem aplicada na solução. Portanto, foi construída uma curva descrevendo a atividade da trombina, contida nas membranas, após a fabricação das mesmas. A metodologia foi adaptada a partir do que está descrito na literatura (VICENTE et al., 2004).

Amostras de 16 mm² (VICENTE; HE; TOLLEFSEN, 2007) de cada membrana foram solubilizadas em 400 μ L de solução 50 mM de Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mg/mL poli (etilenoglicol), em pH 7,4. Após 60 s, foi adicionado 90 μ L de substrato cromogênico para trombina 5 mM (T3068 - Sigma-Aldrich) e sua absorbância foi medida em 405 nm continuamente por 2h, à temperatura ambiente. As análises foram realizadas em triplicata.

O mesmo procedimento foi realizado para as soluções de trombina nas mesmas concentrações utilizadas nas membranas. Para tal, foram adicionadas 10 µL de solução de trombina aos 400 µL de solução 50 mM de Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mg/mL poli (etilenoglicol), em pH 7,4, e após os 60 s, foi adicionado 90 µL do substrato cromogênico 5mM, fazendo a leitura em UV-Vis nas mesmas condições descrita anteriormente.

As medidas de absorbância foram determinadas por análise em um UVvis modCary 1G, Varian, em 405 nm, disponível no Laboratório de Biomateriais, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Essa análise mostrou a atividade da trombina presente na membrana, e permitiu quantificar sua atividade após o processo de eletrofiação, assim como a duração de sua atividade ao longo do tempo analisado, podendo mensurar um "prazo de validade" para o material obtido.

4.4. Caracterização biológica

4.4.1. Teste de Viabilidade celular- MTT

Com o objetivo de avaliar o perfil citotóxico das membranas, foi realizado o teste de MTT (*Vybrand MTT Cell Proliferation Assay, Thermo Fisher Scientific*, USA) em células epiteliais humanas *in vitro*, seguindo a literatura (FERREIRA et al., 2018). O MTT é um método quantitativo baseado na conversão pelas células do reagente MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5diphenyltetrazolium brometo) em cristais de formazana, determinando assim a atividade mitocondrial das células viáveis.

Uma vez em confluência, os queratinócitos humanos imortalizados (células HaCaT), que têm se mostrado um excelente modelo para estudos toxicológicos, foram transferidos para placas de cultura celular de 24 poços, na concentração de 5 x 10⁴ células/poço e posteriormente incubados em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 24h. Após o período de incubação, as membranas de PEO, com e sem trombina, e em diferentes concentrações, foram suspensas dentro dos poços, fixadas em ganchos (figura 11), e permaneceram assim no meio de cultura em contato com as células por 1 e por 24 h, em placas distintas.

Figura 11 - Membranas fixadas em ganchos.



Fonte: A autora

Após esses tempos, os poços foram esgotados, lavados duas vezes com PBS (pH=7,4), para então adicionar 500 µL da solução de MTT a 0,3 mg/mL diluído em meio DMEM. As placas foram incubadas por três horas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com PBS e preenchidos com 200 µL de etanol PA. Finalmente, as absorbâncias foram obtidas através de um micro espectrofotômetro (ASYS UVM340, BiochromLtd, Cambridge, England) a 570 nm, localizado no laboratório de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia da Unicamp.

As amostras foram esterilizadas com óxido de etileno na empresa Acecil (Campinas, São Paulo) e deixadas em repouso por 15 dias antes do início dos testes. O teste foi realizado em triplicata em dois momentos diferentes. Este ensaio foi realizado na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Unicamp.

4.4.2. Teste de Viabilidade celular – *Live/Dead*

O ensaio *Live/Dead* (*LIVE/DEAD*[™] *Viability/Cytotoxicity for mammalian cells, Invitrogen Life Technologies*, USA) é um teste qualitativo que faz uso da microscopia de fluorescência. As células HaCaT foram transferidas para as placas de cultura de células de 24 poços como indicado anteriormente na metodologia do ensaio de MTT. As placas foram incubadas por 24 h e em seguida os tratamentos foram aplicados, isto é, membranas de PEO com e sem trombina, fixadas em ganchos (figura 11), e em diferentes concentrações, foram colocadas suspensas no meio de cultura em contato com as células. Terminado os períodos de incubação de 1 e 24h, em placas distintas, a citotoxicidade das formulações foram verificadas através da marcação pelos reagentes de viabilidade/citotoxicidade para células mamíferas *LIVE/DEAD*[™], seguindo o que foi descrito por Ferreira e colaboradores (FERREIRA et al., 2017).

As células vivas convertem a calceína permeável (calceína-AM) não fluorescente em calceína impermeável fluorescente verde, ao qual se distribui uniformemente pelo citoplasma da célula, por meio da atividade de esterases. As células mortas ou com a membrana danificada são marcadas com o homodímero-1 de Etídio (EthD-1) pela ligação a ácidos nucléicos, emitindo uma fluorescência vermelha. Este marcador é excluído pelas membranas das células intactas.

Foi preparada uma solução contendo uma concentração final de 2 μM de calceína-AM e 4 μM de EthD-1. Aproximadamente 300 μL dessa solução

foram adicionados às placas de cultura. As células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz.

Posteriormente, as imagens foram obtidas através do microscópio invertido Zeiss Axiovert 40 CFL acoplado a uma câmera AxioCam MEC (Carl Zeiss, Alemanha). A calceína foi visualizada, utilizando filtro, na faixa de comprimento de onda 450-490 nm (Ex)/ 515-565 (Em). Já as células marcadas em vermelho foram visualizadas na faixa de comprimento de onda de 528-546 nm (Ex)/ 590-617 nm (Em).

Os ensaios foram realizados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp. As amostras foram esterilizadas com óxido de etileno na empresa Acecil (Campinas, São Paulo) e deixadas em repouso por 15 dias antes do início dos testes. O teste foi realizado em triplicata.

4.4.3. Teste de migração celular in vitro – Scratch Assay

Para avaliação do potencial cicatrizante *in vitro*, foi utilizada a análise de migração celular por meio do método *Scratch assay*, no qual se baseia na criação de uma área de descontinuidade de uma monocamada celular por raspagem. Ou seja, é feito a simulação de uma ferida para realizar o acompanhamento do seu fechamento, observando o crescimento e a migração de células em direção ao centro, sendo monitorada por mensuração utilizando-se microscópio invertido (CORY, 2011).

Para este ensaio, utilizaram-se fibroblastos, por serem mais representativos do processo, da linhagem 3T3 de tecido de pele de camundongo. Garrafas de cultivo estéreis contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) foram acrescidas com fibroblastos e colocadas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas, para alcançarem alta confluência. Após esse período, realizaram-se as subculturas utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprender as células aderidas. Posteriormente, os fibroblastos foram semeados em placas de 24 poços, numa densidade de 5 x 10^4 células/poço, e mantidos em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C, até atingirem confluência máxima.

Constatado a confluência, iniciou-se o ensaio confeccionando as "feridas" com a ponta de uma pipeta de 200 µL, produzindo um risco em linha reta na região média de cada poço. Este procedimento proporciona uma ruptura entre as células, causando a "lesão".

Em seguida, foram aplicados os tratamentos utilizando as membranas de PEO com e sem trombina, cortada em formato circular de 10 mm de diâmetro previamente esterilizadas, e 100 µL das soluções de trombina, nas mesmas concentrações das utilizadas para o preparo das membranas, depositados suavemente sobre o "ferimento" produzido nas células.

A migração dos fibroblastos foi avaliada por meio de fotografias, utilizando-se uma objetiva de longa distância acoplada ao microscópio invertido, sempre com imagem da mesma área dos poços. As placas foram fotografadas a cada 30 min, durante 24 horas em microscópio invertido timelapse, Zeiss Observer Z.1 (Zeiss, Alemanha), através do *software* Zeiss Zen, em aumento de 10x.

Utilizando do programa Image J, o fechamento foi mensurado em todas as imagens, sempre mantendo o mesmo ponto de medida, e a taxa de fechamento da ferida foi calculado de acordo com a equação 1 (PATHALAMUTHU et al., 2019).

$$SCR = \frac{(d_0 - d_2)}{d_0} .100$$
 eq. 1

onde:

SCR = grau de fechamento da ferida (*Scratch Closure Rate*)
d₀=distância entre as bordas da "ferida" no tempo inicial
d₂=distância entre as bordas da "ferida" no tempo analisado (6,12,18,24)

Os dados foram expressos em porcentagem de migração às 0, 6, 12, 18 e 24h após a aplicação do tratamento, fazendo a medida da aproximação das bordas do ferimento e o resultado é a média da migração entre os grupos. A análise foi realizada em quadruplicata no Laboratório de Trombose, Aterosclerose e Terapia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp.

4.4.4. Teste de cicatrização in vivo

A análise do crescimento celular *in vivo* foi realizada de acordo com Santos et al, (2013). Camundongos C57/BI6 machos com 7 semanas de idade pesando em torno de 20 g, obtidos no CEMIB/Unicamp, com livre acesso a comida e água, foram anestesiados com 100 mg/kg de cetamina e 8 mg/kg de xilasina por via intraperitoneal. A região do dorso do animal foi limpa com álcool 70% e realizada tricotomia da região (área dorsal próxima a escápula) (SANTOS et al., 2013).
Foram retiradas 2 amostras com *punch* de biópsia estéril descartável de 6 mm de diâmetro, uma de cada lado do dorso, na qual um dos lados recebeu a membrana, com ou sem trombina, e outro lado recebeu a solução de trombina suficiente para cobrir a ferida. Foi colocado o curativo polimérico e este fixado ao local com esparadrapo micropore (figura 12). Após o procedimento cirúrgico, foi administrado via intramuscular, 25 µL de ibuprofeno, e os animais foram alocados em gaiolas, sendo 3 animais em cada, com livre acesso a comida e água.

Figura 12 - Camundongo após procedimento cirúrgico e com curativo de micropore para fixar a membrana.



Fonte: A autora

As membranas foram cortadas em amostras de 10 mm de diâmetro e enviadas à esterilização por óxido de etileno na empresa ACECIL (Campinas-SP). Entre a utilização e a esterilização, foi aguardado um tempo mínimo de 72h. Os animais foram divididos em 4 grupos com 9 animais cada, e o tratamento aplicado em cada grupo e em cada lado do dorso do animal, consta na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos animais por grupos de estudo e tratamento utilizado.

Grupos	Dorso do animal			
Grupos	Lado esquerdo	Lado direito		
1	Membrana de PEO sem	Controle		
	trombina			
2	Membrana de PEO com	10 µL solução de trombina		
	trombina 2 UI/mL	2 UI/mL		
3	Membrana de PEO com	10 µL solução de trombina		
	trombina 4 UI/mL	4 UI/mL		
4	Membrana de PEO com	10 µL solução de trombina		
	trombina 8 UI/mL	8 UI/mL		

Para análise da reepitelização, as feridas foram medidas fazendo-se uso de um paquímetro digital no dia do procedimento cirúrgico e nos dias de coleta de material (2º, 6º e 10º dias). A área das feridas e seu grau de contração ao longo do tempo foram determinados de acordo com as equações 2 e 3 (BATISTA et al., 2010):

$$A = \pi . R . r$$
 eq. 2

onde:

A= área da ferida (cm²)R= raio maior da ferida

r= raio menor da ferida

$$\% c = \frac{(A_0 - A_i)}{A_0} .100$$
 eq. 3

onde:

% C= grau de contração da ferida

A₀= área inicial da ferida

Ai= área da ferida no dia da biópsia

Nos 2º, 6º e 10º dias após o procedimento cirúrgico, 3 animais de cada grupo sofreram eutanásia por uma superdose de anestésico, sendo aplicado uma dose 5 vezes maior que a indicada. Em seguida, foi delimitado uma área de 10 mm² a partir do centro da lesão para coleta de amostras padronizadas. Os materiais coletados foram fixados em paraformol 4% por 24 h, depois ficaram em solução de álcool 70%, para então serem fixados em parafina e submetidos a corte histológico.

Posteriormente 4 amostras foram coradas com Hematoxilina-Eosina para identificação da espessura do epitélio e vasos sanguíneos; 4 amostras foram coradas com Tricômico de Masson (*EasyPoth*) para identificação do percentual de fibras colágenas, realizado apenas com as amostras do 10º dia do estudo; e por fim o método imunoistoquímico foi realizado com anticorpo

MAC I CD 68 (*Biolegend*) para análise de identificação de macrófago, realizado apenas com as amostras do 2º dia do estudo.

Foi utilizado microscópio óptico da marca Olympus série BX60, conectado a uma câmera digital Q-Color3, acoplado a um computador, fazendo uso do programa QCapture para obtenção das imagens, com aumento de 10x.

Os protocolos utilizados para inclusão em parafina, coloração e fluorescência, constam no anexo 1.

Este teste foi aprovado pelo Comitê de Ética da Unicamp, sob nº 5253-1/2019 (Anexo 2), e desenvolvido no Laboratório de Trombose, Aterosclerose e Terapia Celular do Instituto de Biologia da Unicamp.

4.4.4.1. Análise Estatística

Os dados obtidos no teste de cicatrização *in vivo* foram submetidos à análise estatística utilizando ANOVA e teste Tukey. Em todos os testes foram considerados nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como médias, sendo considerado positivo quando houve um aumento estatisticamente significante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Produção das membranas com e sem trombina

Para se obter a melhor condição no processo de eletrofiação de nanofibras de PEO com um maior grau de organização, variou-se alguns parâmetros selecionados. Foi escolhido variar a vazão e a concentração do PEO, mantendo os demais parâmetros constantes (voltagem, distâncias entre agulha e coletor, umidade relativa), com objetivo de encontrar a melhor condição para obtenção de nanofibras com menor diâmetro, para posteriormente se adicionar as soluções de trombina.

Ressaltando que a viscosidade da solução está relacionada à concentração, massa molar e ao enovelamento das cadeias de polímero. Por estudos prévios, verificou-se que polímeros com maior massa molar produzem fibras com menor número de contas, e soluções com maior viscosidade, ou concentradas, resultam em fibras de maior diâmetro, devido ao maior emaranhamento das cadeias (CASTRO; COSTA; MEI, 2020).

Também é de conhecimento que a vazão interfere no resultado das membranas, de forma que com um aumento da vazão, acarretará em um aumento do diâmetro das fibras e aparecimento de defeitos devido à incapacidade das fibras de secarem completamente antes de atingir o coletor (CASTRO; COSTA; MEI, 2020; SILL; VON RECUM, 2008).

Para o estudo dessas variáveis, foram preparadas membranas a partir de três diferentes concentrações de soluções de PEO, e com 4 diferentes vazões, conforme tabela 1 pág. 57. As membranas foram obtidas com sucesso praticamente em todos os cruzamentos dos parâmetros escolhidos, apenas nos dois últimos cruzamentos de parâmetros, 6,5% - 1,5 mL/h e 6,5% - 2,0 mL/h, não foram obtidas fibras. Isso ocorreu provavelmente devido à alta concentração do polímero, portanto maior viscosidade.

Além disso, as duas vazões maiores usadas neste caso levaram à obtenção de uma quantidade muito grande de material depositada no anteparo, o que dificultou a evaporação do solvente dentro da distância que separava a agulha do coletor. Deste modo, as fibras colapsaram entre si ao entrarem em contato, corroborando com o que é descrito na literatura por outros pesquisadores (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015).

Para evitar esse tipo de problema, ao se utilizar soluções mais concentradas, é necessário diminuir a vazão, que de acordo com a literatura varia entre 0,5 e 1,0 mL/h para o PEO (WANG et al., 2013b).

Com as imagens de MEV, figura 13, foi possível estimar o diâmetro médio das fibras obtidas, com auxílio do programa Image J, conforme consta na tabela 3.

Figura 13 - Imagens de MEV das membranas de PEO sem e com trombina, com diferentes concentrações do polímero e vazão da solução no processo de eletrofiação. Aumento de 10000 vezes.



Fonte: A autora

Concentração PEO (%)	Vazão (mL/h)	Diâmetro médio das fibras (μm)					
2,5	0,5	0,21 <u>+</u> 0,07					
2,5	1,0	0,23 <u>+</u> 0,09					
2,5	1,5	0,26 <u>+</u> 0,11					
2,5	2,0	0,22 <u>+</u> 0,08					
4,5	0,5	0,31 <u>+</u> 0,06					
4,5	1,0	0,19 <u>+</u> 0,03					
4,5	1,5	0,42 <u>+</u> 0,12					
4,5	2,0	0,53 <u>+</u> 0,25					
6,5	0,5	0,41 <u>+</u> 0,07					
6,5	1,0	0,34 <u>+</u> 0,14					
6,5	1,5	Não formou					
6,5	2,0	Não formou					
Soluções de PEO 4,5% e 1,0 mL/h com trombina							
2 UI/mL		0,19 <u>+</u> 0,04					
4 UI/mL		0,27 <u>+</u> 0,07					
8 Ul/mL		0,23 <u>+</u> 0,05					

Tabela 3 - Variação do diâmetro das fibras de PEO em função dos fatoresanalisados.

Com os dados obtidos, foi escolhida a condição de 4,5% de concentração de PEO e 1,0 mL/h de vazão, obtendo-se fibras com o menor valor de diâmetro médio e com o menor desvio padrão. A viscosidade dessas soluções foi bem adequada e dentro dos valores obtidos com as soluções

estudadas (vide tabela 4, pág. 82), o que favoreceu a formação das fibras com as dimensões apresentadas, dentro do esperado.

Com a adição das soluções de trombina, as membranas foram refeitas e as medidas foram mensuradas. Como demonstrado na análise de RMN-Dosy, a trombina apresenta um acoplamento não-covalente com as cadeias do polímero, situação já descrita anteriormente na literatura (COBO et al., 2015), devido às cargas presentes em sua estrutura, resultando em soluções com maior condutividade elétrica e menor viscosidade.

Entretanto, apesar dessas novas condições das soluções, as dimensões das fibras não apresentaram variações significativas quando comparadas às fibras do polímero puro, da mesma concentração, considerando o desvio padrão. Sendo assim, as membranas com adição de trombina apresentaram as características desejadas para o processo de eletrofiação, permitindo prosseguir com as pesquisas e obter membranas para o estudo de liberação controlada e seus efeitos em cobaias.

5.2. Caracterização das soluções poliméricas

Conhecer as características das soluções poliméricas para produção de nanofibras é de extrema importância, pois influenciam em sua morfologia e geometria. Sendo assim, as medidas de viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial das soluções de PEO, com e sem trombina, encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Dados de viscosidade, tensão superficial e condutividade elétricadas soluções de PEO e PEO com trombina.

	Concentração da solução			Solução PEO 4,5% com		
	PEO (%)			trombina		
	2,5	4,5	6,5	2 Ul/mL	4 UI/mL	8 UI/mL
Viscosidade (mPa.s)	280,50	3047,30	16920,00	2218,33	2656,67	2316,67
Tensão Superficial (mN/m)	61,6	61,5	59,9	60,0	59,2	61,7
Condutividade elétrica (µS/cm)	216,7	101,6	103,6	440,3	507,7	375,0

O emaranhamento das cadeias de um polímero é função direta de sua concentração. Quando altamente concentradas, as soluções poliméricas apresentam alta viscosidade, podendo chegar ao ponto de dificultar o fluxo pela agulha e a ejeção da gota em direção ao coletor. Por outro lado, soluções muito diluídas resultam em baixa viscosidade, podendo ocorrer gotejamento na ponta da agulha e impedir a formação de jato e, portanto, da membrana. Deste modo, é primordial que se encontre um balanço para que a viscosidade da solução a ser eletrofiada não produza membranas com defeitos, do tipo contas (COSTA et al., 2012a; RAY et al., 2016).

Mantendo-se fixos os outros parâmetros, encontrar os melhores valores de viscosidade para se obter fibras nanométricas sem defeitos e com diâmetro desejado é importante para o sucesso das pesquisas nesta área. Essa observação é corroborada pela pesquisa de Jin e colaboradores, os quais não conseguiram eletrofiar soluções de seda (*Bombyx Mori*) devido à viscosidade muito baixa. Isso foi solucionado pela adição de soluções de PEO para alcançar uma viscosidade ideal e dar prosseguimento ao estudo (JIN et al., 2002).

Ao comparar a viscosidade das soluções de PEO, em diferentes concentrações, observou-se um aumento considerável deste parâmetro com o aumento da concentração do polímero, seguido de um aumento no diâmetro das nanofibras, que foi de 0,21 para 0,31 e 0,41 µm relativos às concentrações de 2,5%, 4,5% e 6,5% de PEO, respectivamente, como podem ser visto na tabela 3 (item 5.1, pág. 80).

Ao observar os valores de viscosidade da solução de PEO 4,5% com trombina em diferentes concentrações, observou-se que houve uma diminuição considerável desta variável, independente da concentração de trombina utilizada. Isso pode ter acontecido devido à interação entre as cadeias de PEO e trombina, identificada na análise de RMN-Dosy (tratada mais adiante).

A diminuição da viscosidade com o aumento de uma carga pode ser encontrado na literatura, onde Liu e equipe prepararam e caracterizaram nanofibras de PEO com queratina humana, e a viscosidade das soluções diminuiu conforme eles aumentaram a proporção de queratina em suas blendas (LIU et al., 2014). A queratina é uma proteína, assim como a trombina, portanto também possui cargas em sua estrutura, corroborando com os resultados de viscosidade obtidos.

A tensão superficial da solução a ser eletrofiada está diretamente relacionada com a formação do cone de Taylor, pois este acontece quando a

voltagem aplicada no sistema for alta o suficiente para fazer com que as forças eletrostáticas superem a tensão superficial da gota, iniciando o processo de fiação (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015; COSTA et al., 2012a).

Encontra-se descrito na literatura que a diminuição da tensão superficial pode favorecer a formação de fibras sem contas, e que uma voltagem maior aplicada pode superar a tensão superficial da solução e produzir fibras com menor diâmetro (RAY et al., 2016). No caso do PEO, a variação da tensão superficial, que ocorreu com a variação da concentração, não apresentou grandes modificações em todas as concentrações do polímero com e sem trombina (tabela 4), e com a voltagem utilizada (25 kV) permitiu que o processo ocorresse normalmente.

A condutividade elétrica da solução, embora desempenhe um papel menor, pode influenciar o tamanho da fibra. Uma solução altamente condutora é submetida a uma força de tração maior na presença de um campo elétrico do que uma solução com baixa condutividade. De acordo com a literatura, soluções com maior condutividade elétrica são capazes de proporcionar um menor diâmetro médio de fibra, e isso se deve ao aumento da densidade da carga em solução, o que aumenta a força elétrica exercida no jato precursor das fibras (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015; SILL; VON RECUM, 2008).

Com a aplicação de um campo elétrico externo, as cargas da solução se orientam, permitindo que a gota sofra um maior alongamento, resultando em segmentos menos espessos e numa diminuição no diâmetro das fibras, como descrito na literatura (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015).

Os resultados encontrados para a solução de PEO (tabela 4) mostraram que na concentração de 2,5% a condutividade foi maior, e esta apresentou um dos menores tamanhos de diâmetro de fibra, dentre as amostras analisadas (vide tabela 3, pág. 80).

Quando a trombina esteve presente, os valores de condutividade foram todos superiores ao valor para a membrana de PEO puro, de mesma concentração. O aumento da condutividade com a adição de trombina é explicado pelo grande número de cargas presente nas moléculas da proteína, aumentando a densidade de cargas em solução, favorecendo a produção de membranas com menor diâmetro de fibra, de acordo com a literatura (CASTRO; COSTA; MEI, 2020).

Com o conjunto de dados cuidadosamente estabelecidos para o par PEO/trombina, ou seja, viscosidade, tensão superficial e condutividade elétrica, a eletrofiação foi realizada com sucesso, conforme o desejado. A diferença entre as membranas obtidas se deu principalmente no campo do diâmetro das fibras, pois a formação de contas ocorreu apenas nas concentrações de 2,5% de PEO, estrutura esta não desejada para o processo, justificando o porquê desta solução não ter sido escolhida para dar continuidade ao trabalho.

5.3. Caracterização físico-química das membranas com e sem trombina

5.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de MEV é de fundamental importância na técnica de eletrofiação, pois permite visualizar a morfologia das membranas preparadas, como mostram as figuras 14 a 19 deste tópico.

As membranas preparadas com soluções de PEO 2,5% de concentração apresentaram facilidade de processamento (figura 14); entretanto, nota-se que as fibras não se mostraram morfologicamente homogêneas. Em alguns locais observa-se a formação de contas (pérolas), que são mais evidentes nas fibras que foram preparadas com uma vazão maior (figuras 14 C e 14 D).

Figura 14 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de membranas eletrofiadas com PEO 2,5% com aumento de 20000 vezes: A - 0,5 mL/h; B -1,0 mL/h; C – 1,5 mL/h; D – 2,0 mL/h.



25 Detector= SE1

1µm Mag= 20.00 К Х Detector= SE1 LID-25 nn



Fonte: A autora

Detector= SE1 Mag= 20.00 K X 25 mm

Embora sejam consideradas como defeitos, essas estruturas podem apresentar potencial para atuar como reservatórios de medicamentos, com capacidade de mitigar a liberação controlada, diminuindo o efeito *burst* e propiciando uma liberação sustentada (SILL; VON RECUM, 2008). Entretanto, para aplicação no crescimento de células, estas estruturas podem dificultar a aderência das células ao material, sendo então de suma importância o estudo dos parâmetros para obtenção de nanofibras homogêneas e sem contas, a depender da aplicação.

Essas estruturas podem aparecer devido a três situações possíveis: (i) força do campo elétrico, que dependendo da magnitude pode aumentar a instabilidade do jato e proporcionar sua formação; (ii) vazão muito alta, que fornece uma maior quantidade de polímero durante o processo, dificultando a formação da fibra; (iii) curta distância entre a agulha e o coletor, que impede a evaporação total do solvente e dificultará a formação das fibras (COSTA et al., 2012a; NISTA; BETTINI; MEI, 2015).

Apesar da formação dessas contas, as membranas apresentaram bons valores de diâmetro de fibra (vide tabela 4, pág. 82), exibindo valores de $0,21\pm$ 0,07 µm para a vazão de 0,5 mL/h (figura 14 A), $0,23\pm$ 0,09 µm para a vazão de 1,0 mL/h (figura 14 B), $0,26\pm$ 0,11 µm para vazão de 1,5 mL/h (figura 14 C) e $0,22\pm$ 0,08 µm para vazão de 2,0 mL/h (figra 14 D), sem diferenças significativas entre si, característica provavelmente adquirida devido à baixa concentração das soluções, e portanto, baixa viscosidade e maior condutividade elétrica quando comparada com as demais soluções.

A despeito dos bons resultados com os diâmetros das fibras, foram encontradas dimensões menores e com menor desvio padrão nos outros parâmetros estudados, como será discutido adiante. Além disso, é sabido que nanofibras alinhadas podem ser usadas para orientar as células em uma direção específica necessária para fornecer a anisotropia encontrada em certos órgãos (HASAN et al., 2014), e em uma análise visual, as membranas de 2,5% de PEO não apresentaram qualquer grau de organização na deposição de suas fibras.

Quando a concentração de PEO aumentou de 2,5 para 4,5%, as fibras apresentaram uma estrutura visualmente mais organizada, sendo mais uniformes e com formato cilíndrico, sem formação de contas em nenhuma das vazões utilizadas (figura 15).

Figura 15 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de membranas eletrofiadas com PEO 4,5% com aumento de 20000 vezes: A – 0,5 mL/h; B – 1,0 mL/h; C – 1,5 mL/h; D – 2,0 mL/h.



Fonte: A autora

As medidas dos diâmetros das fibras foram mensuradas, e os valores encontrados foram 0,31 \pm 0,06 µm para a vazão de 0,5 mL/h (figura 15 A), 0,19 \pm 0,03 µm para a vazão de 1,0 mL/h (figura 15 B), 0,42 \pm 0,12 µm para a vazão de 1,5 mL/h (figura 15 C) e 0,53 \pm 0,25 µm para a vazão de 2,0 mL/h (figura 15 D).

Esses valores são coerentes com a literatura, pois com uma concentração maior, a viscosidade tende a aumentar e induzir a formação de fibras com maiores valores de diâmetro. Esta solução de 4,5% de PEO também

apresentou menor condutividade elétrica, o que também resulta em um aumento de diâmetro das fibras, uma vez que soluções menos condutoras, estarão submetidas a uma força de tração menor na presença de um campo elétrico (HASAN et al., 2014; NISTA; BETTINI; MEI, 2015).

Entretanto, foi nesta concentração que se obteve o menor diâmetro de fibras e com menor desvio padrão, utilizando a vazão de 1,0 mL/h. Neste ponto, estabeleceu-se os melhores parâmetros para dar continuidade na pesquisa.

A escolha dos parâmetros baseados no tamanho e distribuição de fibras é bastante coerente, uma vez que para aplicação das membranas como biomaterial ou como *scaffold*, menores dimensões são desejadas, pois fornecem maior área de conato. Assim, estas se assemelhariam às dos componentes da matriz extracelular, podendo simular ambientes teciduais, com elevada organização e permanência da funcionalidade das células, conforme relatado pela literatura (AHMED; LALIA; HASHAIKEH, 2015; COSTA et al., 2012b).

De acordo com Frohbergh e colaboradores, a arquitetura nanofibrosa pode ser benéfica em termos de proliferação, diferenciação e mineralização de células osteoprogenitoras. A eletrofiação de polímeros com substâncias bioativas pode melhorar ainda mais as propriedades biomiméticas dos *scaffolds* nanofibrosos e, portanto, melhorar a ligação celular, a diferenciação osteoblástica e a síntese da matriz extracelular (ECM) óssea (FROHBERGH et al., 2012).

Tal característica é também defendida por Zarghami e equipe, que relatam que, o processo de eletrofiação é eficaz na fabricação de fibras na

faixa de diâmetros de tamanho micro ou nano. Além disso, sua alta porosidade, tamanho de poros pequeno e com grande superfície de contato (razão área/volume) tem um bom potencial para as aplicações biomédicas (ZARGHAMI et al., 2015).

Na última variação dos parâmetros, devido à alta concentração do polímero, 6,5%, obteve-se membranas apenas nas vazões de 0,5 e 1,0 mL/h (figura 16), convergindo com informações da literatura (WANG et al., 2013b). Maiores vazões entregam uma maior quantidade de material durante o processo, e associado a soluções de alta viscosidade, não favorecem a formação de fibras (SILL; VON RECUM, 2008), o que justifica os resultados obtidos nestes últimos cruzamentos de parâmetros.

Figura 16 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de membranas eletrofiadas de PEO 6,5% com aumento de 20000 vezes: A - 0,5 mL/h; B - 1,0 mL/h.



Fonte: A autora

Apesar de não ter formação de contas nessas condições, maiores medidas de diâmetro das fibras foram encontrados, 0,41±0,07 µm para a vazão

de 0,5 mL/h (figura 16 A) e $0,34\pm0,14$ µm para a vazão de 1,0 mL/h (figura 16 B). Esses resultados corroboram informações já conhecidas, em que maior viscosidade e menor condutividade elétrica induzem o aumento do diâmetro das fibras (SILL; VON RECUM, 2008), como já discutido anteriormente.

Para as vazões mais elevadas, 1,5 e 2,0 mL/h, na qual não obtivemos sucesso, observou-se durante o processo que a solução, ao alcançar o coletor, se depositava em grande quantidade sobre o mesmo. Possivelmente, se o coletor estivesse a uma distância maior que a utilizada, talvez as fibras teriam se formado; isto é, a pequena distância provavelmente impossibilitou que o solvente evaporasse, para que a fibra fosse formada.

A partir de todas essas informações, nota-se a importância de se definir os parâmetros do processo de eletrofiação para se obter fibras homogêneas e com dimensões adequadas sem a presença de pérolas. Isso garantirá uma boa eficiência da membrana no transporte das moléculas dos fármacos, ou mesmo serem usadas como *scaffolds* no crescimento de tecidos (KRSTIĆ et al., 2017).

Na sequência do trabalho, utilizando os parâmetros ideais escolhidos para a adição do princípio ativo, membranas com 4,5% de PEO foram preparadas, adicionando-se trombina nas concentrações de 2, 4 e 8 UI/mL, que foram analisadas por MEV.

A quantidade de trombina adicionada foi mensurada baseada em uma quantidade da mesma por área de membrana (EVERLAND et al., 2013). Ressalta-se, porém, baseado em conhecimentos prévios, que membranas obtidas por eletrofiação não possuem uma área definida; assim, não é raro obter-se membranas com tamanhos de área diferentes dependendo do polímero utilizado. Quanto à quantidade de trombina, esta pode variar dependendo do uso pretendido do dispositivo; quanto maior o sangramento a ser tratado, maior a concentração de trombina desejada, podendo estar em uma faixa de 1 Ul/cm² a 1000 Ul/cm² de membrana. Prosseguindo o trabalho, adotou-se uma quantidade efetiva de trombina na recuperação de lesões, já descrita anteriormente (GUGERELL et al., 2014), equivalente a um volume de 100 μ L, fixado para as demais concentrações.

Figura 17 - Membranas PEO 4,5% com trombina 2 UI/mL - 10000 e 120000 vezes de aumento e histograma da variação do tamanho das fibras.





Fonte: A autora

As membranas com trombina mantiveram o visual uniforme obtido com as membranas do polímero puro, ou seja, a adição de trombina, independente da concentração, não interferiu na morfologia das fibras, que continuaram a não apresentar a formação de contas.

Figura 18 - Membranas PEO 4,5% com trombina 4 UI/mL - 10000 e 120000 vezes de aumento e histograma da variação do tamanho das fibras.





Fonte: A autora

Observa-se normalmente na literatura que a adição de alguma carga modifica a morfologia de fibras eletrofiadas, tal como mostra o trabalho de Liu e colaboradores ao eletrofiarem PEO/queratina. Esses pesquisadores observaram que para algumas proporções destas substâncias, houve a formação de contas (LIU et al., 2014). O mesmo ocorreu com Santos e equipe, que ao eletrofiarem PLA/*Sedum dendroideum* observaram a modificação

completa das estruturas, com formação de muitas contas nas membranas (SANTOS et al., 2013).

A divergência observada entre os resultados obtidos com PEO/trombina possivelmente deveu-se à pequena quantidade, em volume, de trombina adicionada ao sistema.

O diâmetro das fibras foi mensurado (vide tabela 3, pág. 80), apresentando os valores de $0,19\pm0,04$ µm para a solução com 2 Ul/mL (figura 17 C), $0,27\pm0,07$ µm para a solução com 4 Ul/mL (figura 18 C) e $0,23\pm0,05$ µm para a solução com 8 Ul/mL (figura 19 C), médias um pouco maiores que a do polímero puro, mas sem diferenças significativas entre si.

Figura 19 - Membranas PEO 4,5% com trombina 8 Ul/mL - 10000 e 120000 vezes de aumento e histograma da variação do tamanho das fibras.





Fonte: A autora

Notou-se que após a adição de trombina, ocorreu a diminuição da viscosidade e o aumento da condutividade elétrica, fato que resultaria numa diminuição do diâmetro das fibras (RAY et al., 2016). Entretanto, considerando o desvio padrão de todas as medidas, de membranas com e sem trombina, pode-se afirmar que o tamanho das fibras se manteve dentro da mesma faixa de dimensão, por possivelmente a modificação das propriedades não ter sido suficiente para causar uma diminuição significativa do diâmetro das fibras produzidas.

Visualmente, as membranas com 2 UI/mL (figura 17 A) se mostraram menos organizadas que as demais (figuras 18 A e 19 A), com fibras mais tortuosas e menos alinhadas. Como é descrito na literatura que nanofibras mais alinhadas podem auxiliar no crescimento de células (HASAN et al., 2014), é esperado que as membranas com 4 e 8 UI/mL apresentem um desempenho melhor nas análises de crescimento de tecido *in vitro* e *in vivo*.

5.3.2. Análise de grupamentos químicos por ATR - FTIR

Para verificar se o princípio ativo permanecia nas membranas após o processo de eletrofiação, foi realizada a análise de FTIR para identificação de bandas de transmitância de trombina na membrana, e o resultado foi comparado com bandas de uma membrana de PEO puro. Os espectros obtidos podem ser vistos na figura 20.

Figura 20 - Espectro FTIR em modo transmitância da membrana de PEO puro, membrana de PEO/trombina e da solução de trombina.



Fonte: A autora

Segundo a literatura, as bandas típicas de uma proteína são baseadas na molécula modelo N-metil-acetamida, que apresenta uma banda em 3300 cm⁻¹ correspondente às vibrações dos grupos N-H; uma banda em 1650 cm⁻¹, que é associada a um grupo de vibrações, sendo 80% do estiramento do grupo carbonila, 10% de deformação angular –CNH e 10% de estiramento –CN. Ainda há outra banda em torno de 1300 cm⁻¹, que corresponde a uma sobreposição de vários grupos de vibrações (C=O; CN; CNH; OCN; entre outros) (FORATO et al., 2010).

Corroborando com esta afirmação, Liao e colaboradores utilizaram o FTIR no desenvolvimento de um método de biossensibilidade para monitorar processos bioquímicos em superfícies. No estudo foi apresentado um espectro de soluções de trombina em diferentes concentrações, e também obtiveram bandas na faixa entre 3200-3500 cm⁻¹, que foram atribuídas às ligações N-H (LIAO et al., 2006).

Em consonância com esses valores encontrados na literatura, o espectro da trombina pura, representado pela curva em azul na figura 20, apresenta as bandas na faixa característica das proteínas, entre 3200 e 3500 cm⁻¹ para vibrações dos grupamentos N-H, e entre 1500 e 1700 cm⁻¹, para os grupos carbonila.

Bandas entre 3000 e 3800 podem estar relacionados à água, como pode ser encontrado na literatura (ROSA; DISALVO; FRIAS, 2020), o que se faz coerente uma vez que a trombina usada para a análise estava em solução aquosa. Entretanto, a banda entre 1500 e 1700 são frequentemente encontradas em estudos envolvendo proteínas, como característica da carbonila (ABROSIMOVA; SHULENINA; PASTON, 2016; ANDRADE et al., 2019), ratificando os resultados encontrados nesta análise para a trombina.

O espectro do PEO puro, curva em preto, apresenta picos ao redor de 2800, referente ao estiramento vibracional do CH₂ assimétrico do polímero, entre 1200 e 1100 cm⁻¹, de vibrações do estiramento C-O-C de grupo éter na fase cristalina. Picos de fraca intensidade entre 1250 e 1500 cm⁻¹ correspondem a vibrações de deformação do C-H. A presença da banda em torno de 960 cm⁻¹ é um indicativo de conformação helicoidal do PEO (BURGAZ, 2011; RATNA; ABRAHAM; KARGER-KOCSIS, 2008).

Na literatura, são encontrados esses mesmos valores para o PEO puro, como mostra o trabalho de Burgaz (2011) que preparou compósitos de PEO/argila/sílica. Ele identificou os picos de 1150, 1100 e 1060 cm⁻¹ para o polímero puro, destacando estarem relacionados aos modos de alongamento simétrico e assimétrico dos grupos C-O-C, presentes no polímero. Ainda ressaltou o fato de existirem bandas na faixa entre 1000 - 900 cm⁻¹, pertencentes aos modos de vibração do CH₂ presente na molécula de PEO (BURGAZ, 2011).

Esses picos também foram observados, em menor intensidade quando comparados com os picos das ligações C-O, no espectro do PEO puro e o PEO/trombina, vide figura 20. Ravindar Reddy e colaboradores também encontraram os mesmos valores de bandas características dos grupos C-O-C do PEO, na faixa de 1100 cm⁻¹, ao estudarem blendas de PMMA/PEO (RAVINDAR REDDY et al., 2016).

Lu e colaboradores encontraram os mesmos valores de bandas para esse grupo C-O, ao testarem a condutividade térmica de membranas eletrofiadas de PEO (LU et al., 2017). Todos esses exemplos da literatura, independente da forma testada do polímero, em blendas, puro, filme ou membrana, corroboraram com os resultados aqui demonstrados na figura 20.

Por sua vez, o espectro do conjunto PEO/trombina, realizado com a membrana, não apresentou as bandas observadas na trombina, apenas as observadas no polímero. Na análise de blendas e compósitos, o espectro de FTIR deve apresentar as bandas de ambos os materiais do conjunto, mesmo que em menor intensidade (RAVINDAR REDDY et al., 2016).

Um exemplo vem do trabalho de Li e Yang, em que prepararam um material bioativo com acetato de celulose/PEO e rutina (ou vitamina P) como princípio ativo, e no espectro desta blenda foi observado uma ligeira alteração da banda característica da ligação O-H da fibra acetato de celulose/PEO. Esta mudança foi interpretada pelos autores como uma interferência da cetona

insaturada presente na rutina, mostrando que houve interação entre as substâncias utilizadas no preparo da blenda (LI; YANG, 2020).

Neste resultado não se observou trombina no espectro de PEO/trombina, que constitui a membrana. Considerando-se a hipótese da trombina ter sido encapsulada pelo PEO e que a técnica não foi capaz de detectar a mesma no interior das fibras e/ou que a técnica não foi eficiente para detectar trombina numa concentração baixa, buscou-se utilizar uma técnica mais apurada, como ¹H-NMR- Dosy que será discutida a seguir.

5.3.3. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e DOSY

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear foi usada para identificar a presença de trombina nas nanofibras PEO/trombina, cujos espectros de RMN-¹H são mostrados na figura 21 A-B. A técnica possui como vantagem conseguir captar concentrações mínimas em misturas de substâncias (REILE et al., 2017), o que nem sempre é possível em outras técnicas como FTIR, por exemplo. **Figura 21 -** (A) espectros de ¹H RMN de PEO (verde), trombina (azul) e PEO / T2U (magenta) e (B) zoom dos espectros de ¹H RMN. (C) Coeficientes de difusão determinados a partir de medições de ¹H DOSY das amostras PEO (verde) e PEO / trombina (magenta) e (D) zoom dos espectros ¹H DOSY.



Fonte: A autora

O espectro de PEO mostrou um pico centrado em 3,7 ppm relacionado aos prótons da principal cadeia polimérica ($CH_2 - CH_2 - O$), corroborando com o que está descrito na literatura.Heng e colaboradores, ao trabalharem com copolímero de PEO-b-carboxi-terminal-butadieno-acrilonitrila, encontraram o mesmo valor de 3,65 ppm para o pico correspondente ao PEO presente no copolímero (HENG et al., 2015). Também, em seus estudos, Lemma, Bossard e Rinaudo utilizaram a técnica de RMN para investigar as alterações químicas em nanofibras de Quitosana/PEO e identificar ácido acético residual nas mesmas. Novamente o pico referente ao PEO, em 3,73 ppm foi detectado (LEMMA; BOSSARD; RINAUDO, 2016). Além disso, o pico a 4,7 ppm está relacionado à água residual, seguindo o que já está descrito na literatura (DE MOURA RIBEIRO et al., 2017).

Os sinais próximos de 8,0 e de 1,4 ppm também foram observados e estão relacionados a impurezas ou contaminação. No caso do espectro da trombina, foram observados sinais típicos de 0,5 a 4,5 ppm, correspondendo a prótons alifáticos da proteína, assim como também é descrito na literatura (CLEARY; TRUMBO; MAURER, 2002).

O espectro de PEO/Trombina mostrou sinais de ambos os componentes (PEO e trombina), confirmando que a trombina estava presente na membrana eletrofiada. Além disso, uma vez que não foi observado desvio do pico do PEO após a adição de trombina, provavelmente não houve reação química entre as substâncias durante a mistura. Assim, a hipótese mencionada anteriormente da encapsulação da trombina pelo PEO ganhou força.

A espectroscopia de RMN ordenada por difusão (DOSY) foi realizada para fornecer informações adicionais sobre a interação PEO/trombina, uma vez que essa técnica permite a discriminação de moléculas em solução de acordo com suas taxas de difusão (REILE et al., 2017).

Os espectros de DOSY-RMN são apresentados na figura 21 C e 21 D e revelaram que o coeficiente de difusão de PEO/Trombina era menor que o coeficiente do PEO puro, ambos em água deuterada (D₂O). A diminuição do

coeficiente de difusão do conjunto PEO/Trombina pode estar relacionada a uma interação secundária forte entre as cadeias do polímero e da proteína, o que possivelmente dificultou a mobilidade do conjunto.

De acordo com a literatura, diferentes tipos de interação, como Van der Walls e ligação de Hidrogênio, podem atrasar o transporte da estrutura em um meio, interferindo no coeficiente de difusão (LAJARRIGE et al., 2019). Também é descrito na literatura que analitos mais leves apresentam difusão mais rápida, e vice-versa (REILE et al., 2017), sendo assim, é entendível que essa possível interação entre as cadeias de PEO e trombina, pode ser compreendido como um aumento da massa molar do conjunto, que resultou na diminuição da difusão.

A literatura relata que proteínas e polímeros podem ser conjugados através de ligações covalente ou não covalentes por acoplamento reativo ou afinidade, método chamado "*grafting – to*", o mais comum na construção de bioconjugados poliméricos, que propicia a retenção da atividade da biomacromolécula, através de uma alta eficiência de acoplamento (COBO et al., 2015). Sendo o PEO um poliéter, não apresentando grupos reativos, essa interação entre as cadeias seria de natureza não covalente, possivelmente interações intermoleculares do tipo ligação de Hidrogênio, entre os -OH terminais do polímero e as cargas da proteína.

Assim, os resultados obtidos sugerem uma boa interação entre PEO e trombina, mostrando que o material bioconjugado obtido mostrou melhorias nas propriedades físicas e responsivas às células, como já discutido nos resultados das outras análises, justificado pela existência dessa interação.

O resultado fornecido pela técnica foi fundamental para se esclarecer a presença de trombina na membrana e, mais ainda, para se observar a interação entre elas.

Essa característica obtida traz uma informação importante para o estudo, pois, como já é de conhecimento, membranas obtidas por eletrofiação apresentam uma pequena espessura, e esta característica para aplicação na liberação controlada pode ser uma desvantagem. Lembramos que, a difusão do princípio ativo está relacionada à espessura do dispositivo, que quanto menor mais rápida esta difusão ocorrerá. Como consequência, o efeito *burst* aumentará, mudando o perfil das taxas de liberação dos medicamentos, que passam a ser rápidos demais para serem terapeuticamente benéficos (SILL; VON RECUM, 2015).

Então a interação observada entre PEO e a trombina no RMN - Dosy pode funcionar como um retardante na liberação da trombina, aumentando sua eficiência para a aplicação desejada.

5.3.4. Dicroísmo Circular (CD)

O entendimento entre a estrutura e a função desempenhada por uma proteína é um passo necessário para o desenvolvimento de biomateriais biofuncionalizados, scaffolds, sistemas de liberação de medicamentos, recobrimento de feridas, dentre outras aplicações. Devido a isso, a análise de dicroísmo circular foi realizada com o intuito de determinar a possível interação entre o PEO e a trombina, assim como indicar a manutenção de sua atividade

após o processo de eletrofiação identificando suas estruturas secundárias. O espectro da análise pode ser visto na figura 22.

Figura 22 - Espectros de dicroísmo circular da trombina pura (A) e das membranas com trombina (B).



Fonte: A autora

Em geral, quando um ligante se liga a uma proteína, ele causa uma certa mudança em sua estrutura secundária, desta forma, na espectroscopia de dicroísmo circular, as alterações conformacionais na proteína causada pelo ligante podem ser avaliadas medindo a estrutura secundária da proteína (CHEN et al., 2019).

Em um típico espectro de dicroísmo circular pode-se observar um pico de banda positivo em 190 nm e dois negativos em 208 e 222 nm para conformação α -hélice, um pico positivo em 196 nm e um pico negativo em 218 nm para a conformação β -folha e um pico positivo em 212 nm e um pico negativo em torno de 195 nm para estruturas aleatórias (*random coil*), como mostrado na figura 10 na pág. 64 (MILES; WALLACE, 2016). Partindo desses parâmetros e observando o espectro da trombina pura (figura 22 A), nota-se que há um pico em 190 nm para a proteína, também detectada pela banda amida no FTIR referente à conformação de predominância α-hélice. Entretanto, não foram obtidos os picos negativos que caracterizam essa estrutura, possivelmente pelo fato da proteína estar em processo de desnaturação, o que faria com que não fossem observados picos nesta análise (BURRIDGE et al., 2020).

Analisando o espectro dos conjugados polímero-proteína (figura 22 B), observa-se que a interação entre as cadeias fez com que picos positivos e negativos aparecessem, podendo identificar a conformação que a trombina adquiriu ao se ligar com o PEO. Contudo, comparando com os valores de referência dos picos para dicroísmo circular, conclui-se que o polímero pode ter causado instabilidade conformacional na proteína, uma vez que os picos foram deslocados.

Nota-se um pico positivo em torno de 200 nm para os agrupamentos PEO/T2U e PEO/T4U, o que pode indicar uma conformação do tipo β -folha, porém em nenhum dos dois casos foi obtido o pico negativo característico dessa estrutura. Já para o agrupamento PEO/T8U são observados picos positivos em 190, 198 e 214 nm, e um pico negativo em torno de 206 nm, características mais próximas das estruturas α -hélice e β -folha.

Chen e equipe (2019) estudaram a interferência da ligação de um anticoagulante à trombina em sua estrutura secundária. Como resultado observaram que com o aumento do anticoagulante, e consequentemente perca da atividade da trombina, houve a modificação da estrutura da proteína, passando de β-folha para estrutura aleatória (*random coil*) (CHEN et al., 2019).

O contrário foi observado em nossos resultados, onde a trombina que foi conjugada ao PEO manteve suas estruturas de α -hélice e β -folha, justificando a manutenção de sua atividade.

Ainda assim, pode-se afirmar que embora a proteína apresente estrutura secundária, não estando então desnaturada, esta se difere da estrutura proteica inicial, e apesar da associação da trombina com o PEO ter mudado a estrutura da proteína, esta continua apresentando as estruturas secundárias que lhes são características, de acordo com a literatura (XU et al., 2020), o que possibilita a manutenção de suas funções.

A diferença apresentada na membrana de PEO/T8U em comparação com as outras duas formulações possivelmente se deu devido à maior concentração da proteína e, portanto, maior disponibilidade de sítios ativos presentes, fazendo com que seu espectro se apresentasse mais semelhante à da trombina pura (figura 22 A) e ao que é descrito na literatura (XU et al., 2020).

Estudos de bioconjugados entre polímeros e proteínas tem sido desenvolvido há bastante tempo, entretanto, maiores informações sobre as estruturas desses agrupamentos ainda apresentam dados experimentais limitados no meio científico. Burridge e colaboradores desenvolveram um estudo sobre polímeros conjugados à proteína ubiquitina, no qual conseguiram obter informações sobre estabilidade e desnaturação dos complexos, sendo que o ganho de estabilidade que encontraram, foi atribuída à interação entre polímero e a proteína (BURRIDGE et al., 2020).

Lee e equipe desenvolveram hidrogel de peptídeos conjugados com polímeros funcionalizados com bivalirudina, um inibidor de trombina, e apesar

107

das misturas no complexo, as características dos hidrogéis foram mantidas e a proteína manteve sua estrutura inicial. E após a realização dos trabalhos, concluíram que devido à manutenção das propriedades, este material tem potencial para aplicação em transplante de células na medula espinhal (LEE et al., 2020).

Sendo assim, baseado na literatura e nas análises de Dosy, discutidas anteriormente, e de UV (a ser tratada mais adiante) realizadas nesta pesquisa, concluímos que a associação do PEO e da trombina, fez com que a atividade da proteína fosse mantida após a produção das membranas, e que possivelmente o polímero funcionou como suporte para a atuação da trombina *in loco*, demonstrada no teste de migração celular *in vitro* (a ser tratada mais adiante).

5.3.5. Ensaio Mecânico – DMA

Os resultados encontrados nesta análise para as membranas de PEO, com e sem trombina, mostraram o efeito da adição da proteína nas propriedades termomecânicas das membranas.

Na presença de trombina o módulo de armazenamento (E') do polímero a 25° C aumentou, para as concentrações 2 e 4 Ul/mL. Entretanto para a concentração de 8 Ul/mL houve uma significativa diminuição, como pode ser visto na tabela 5.
Amostras	E' (MPa)⁺	T _g (°C)**
PEO 4,5%	42.1	-52
PEO/T2U	294.5	-45
PEO/T4U	1146.2	-45
PEO/T8U	733.5	-45

Tabela 5 - Valores do módulo de armazenamento (E') e Tg de PEO e PEO / trombina.

* valor do módulo observado a 25 °C. ** valores de Tg obtidos do pico δ tan

Esse resultado pode ser atribuído ao acoplamento entre trombina/PEO, já comprovada na análise DOSY, que incentivou a formação de uma estrutura mais rígida do conjugado formado, devido à presença da trombina. Proteínas podem aumentar o módulo elástico de blendas com sua presença, impondo maior rigidez ao sistema (SELVAKUMAR; MEENAKSHISUNDARAM, 2019).

Essas interações também podem explicar o motivo do módulo de armazenamento ter gradualmente aumentado nas concentrações de 2 e 4 UI/mL de trombina, mas terem diminuído na concentração de 8 UI/mL, uma vez que a quantidade de PEO foi a mesma para todas as membranas, pressupõese que a disponibilidade de polímero para interagir com a trombina possa ter se esgotado, diminuindo a interação entre as cadeias. Essa característica também foi observada nas medidas de viscosidade e condutividade elétrica das soluções.

O aumento do módulo de armazenamento também foi observado por Burgaz (2011), que produziu nanocompósitos de PEO/argila/sílica e observaram um aumento significativo do E' com a adição das cargas, quando comparado ao polímero puro, e esse aumento foi indicado devido a interação polímero-partícula, que fez com que se formasse uma rede física, oferecendo maior reforço ao nanocompósito (BURGAZ, 2011).

Qin e colaboradores observaram a mesma situação ao prepararem nanofibras de quitosana com pululana (polissacarídeo constituído de unidades de maltotriose). Eles observaram que o módulo de armazenamento aumentou com a adição de quitosana, em proporções de até 30% de quitosana nas blendas estudadas, aumentando a rigidez do material (QIN et al., 2019).

Temos também vários autores que relatam uma dependência da massa molar com as propriedades termomecânicas do polímero (RIVERA NICHOLLS et al., 2019; WANG et al., 2020b). Como as medidas de DOSY sugeriram um aumento na massa molar do polímero, devido à bioconjugação entre trombina e PEO, o aumento do E' pode ser atribuído a essa associação PEO-trombina.

A temperatura de transição vítrea (Tg), parâmetro também obtido por análise térmica, foi afetada pela adição de trombina; as Tg do PEO puro e do conjunto PEO/trombina, foram de -52 e -45 ° C, respectivamente. O aumento de Tg após a adição de trombina também pode estar relacionado ao acoplamento trombina/PEO, onde a trombina introduziu certa rigidez ao PEO, bem como a própria rigidez da trombina que é uma proteína helicoidal. Assim, tanto a interação secundária das moléculas como a estrutura rígida da trombina colaboraram para o aumento da Tg.

Esta situação é corroborada pela literatura, por Burgaz, (2011), ao analisar a Tg de blendas de PEO/argila/sílica. As temperaturas aumentaram com o aumento da concentração de argila e sílica nas blendas, bem como a

resistência do material, devido às cargas restringirem a mobilidade das cadeias do PEO (BURGAZ, 2011).

Também, Qin e colaboradores observaram um aumento da Tg com o aumento da quantidade de quitosana nas blendas com pululana. Isso ocorreu devido à rigidez da estrutura da quitosana, um polissacarídeo natural, que inclusive causou uma melhora na estabilidade térmica dos filmes estudados (QIN et al., 2019).

Os resultados aqui obtidos mostram que o material desenvolvido pode ser utilizado no recobrimento de feridas, pois apresenta propriedades mecânicas para tal.

5.3.6. Estudo da atividade da Trombina na membrana (UV-Vis)

Todas as técnicas de caracterização confirmaram a presença de trombina nas soluções e nas membranas eletrofiadas. Como foi constatado, a viscosidade das soluções diminuiu, a condutividade elétrica do sistema aumentou, o RMN evidenciou picos característicos de prótons alifáticos da trombina na membrana, o DOSY demonstrou que o coeficiente de difusão diminuiu para as membranas de PEO/trombina e, por último, o módulo de armazenamento (E') das membranas aumentou com a adição de trombina. O próximo passo foi determinar a atividade da trombina, após o processamento da membrana por eletrofiação.

O método para a determinação da atividade de trombina é baseado na diferença de absorbância entre o substrato original e o produto resultante da quebra feita pela trombina, de uma porção terminal do substrato. A taxa de formação deste produto é determinada seguindo-se o aumento da absorbância por segundo em 405 nm e é proporcional à atividade enzimática. Sendo assim, quanto maior a atividade da trombina, mais substrato será convertido e, portanto, maior será a absorbância.

Na figura 23 temos as curvas de absorção da trombina nas três concentrações utilizadas para o preparo das membranas (curvas em vermelho), das soluções de trombina nas mesmas concentrações (curvas em verde), e da membrana de PEO puro (curvas em preto).

Figura 23 - Atividade da trombina nas membranas de PEO e em solução tampão, PEO/T2U (A), PEO/T4U (B) e PEO/T8U (C).



Fonte: A autora

Observa-se que a trombina ainda apresenta atividade após o processamento por eletrofiação, e que esta atividade se apresentou maior que das soluções pura de trombina. Esta análise foi realizada com membranas que estavam armazenadas sob refrigeração por 3 meses, e mesmo após esse período, a atividade da trombina foi mantida.

Na curva da trombina 2 UI/mL (figura 23 A), é observado que a atividade da trombina encapsulada na membrana apresenta um crescimento até os primeiros 2000 s e depois mantém um crescimento menor, porém constante, e que durante o tempo analisado não apresenta decréscimo de atividade.

Na curva da membrana com trombina 4 UI/mL (figura 23 B) vê-se um pico de atividade em 2000 s, e esta permanece, em declínio, até os 3500 s, quando passa a apresentar zero atividade. Para a membrana com trombina 8 UI/mL (figura 23 C) a atividade máxima se deu em 4000 s, porém não alcançou zero atividade durante no tempo estudado (2 h).

Todas as membranas analisadas foram capazes de manter a atividade da trombina, mesmo após o processo de eletrofiação, sendo esta atividade sempre maior que a das soluções de trombina pura, o que sugere uma sinergia cooperativa entre trombina e PEO. Já foi demonstrado que o acoplamento entre as cadeias de um polímero e de uma biomacromolécula para se obter bioconjugados, é capaz de apresentar um alto rendimento com atividade retida (COBO et al., 2015).

Um fato interessante é que a hirudina (anticoagulante extraído de sanguessugas), atua ligando-se diretamente em vários locais da trombina. A partir dos nitrogênios se liga aos sítios ativos da trombina, e com os carbonos

se liga nos exosítios distantes dos seus sítios ativos (HUANG et al., 2014). Uma vez que o PEO é um polímero que não apresenta nitrogênio em sua composição, a interação apresentada entre ele e a trombina provavelmente não se deu em locais próximos aos sítios ativos, justificando a atividade da trombina encapsulada ter sido mantida.

A trombina apresenta dois exositios, sendo o exosítio I formado majoritariamente por cargas positivas, e está relacionado à possibilidade de se ligar à hirudina e com funções relacionadas à coagulação no processo de hemostasia. Já o exosítio II apresenta carbonos terminais e locais para interação com ligantes polianiônicos (MARAGOUDAKIS; TSOPANOGLOU, 2009).

Partindo da hipótese de que o PEO atuaria, em sua interação com a trombina, de modo diferente da hirudina, e que este polímero apresenta oxigênio em suas extremidades, podendo estar carregado negativamente, possivelmente, a interação entre PEO e trombina se deu no âmbito do exosítio II, deixando liberado o exosítio I responsável pelas funções da coagulação, justificando o aumento da atividade apresentado na análise do UV e verificado no teste de migração *in vitro*.

As membranas apresentaram atividade de trombina mais acentuada apenas no começo da análise, ou seja, depois que solubilizada a membrana em solução tampão, a trombina manteve sua atividade por pouco tempo, entretanto esse curto tempo de atividade, não pode ser considerado um fator negativo, já que a hemostasia, primeira etapa da cicatrização e onde a trombina é mais requisitada, ocorre imediatamente após a lesão (GUO; DIPIETRO, 2010).

114

Vendramin, Franco e Franco estabeleceram um método para obter gel de plasma rico em plaqueta, para utilização em cirurgia plástica. Nesse método eles também obtiveram trombina autóloga do próprio plasma, e através do ensaio realizado por eles, conseguiram obter trombina com atividade de 8,55 Ul/mL. Essa trombina foi utilizada para ativar as plaquetas do plasma e fazer dele um gel, que a princípio estava no estado líquido. Este processo ocorreu de forma rápida, com duração de 30 a 60 segundos após o contato da trombina com o plasma (VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009), o que indica que o tempo de atividade do material proposto é suficiente para atender a aplicação desejada.

Assim também, na análise de migração celular *in vitro*, que falaremos mais adiante, as membranas de PEO com trombina incentivaram a migração celular, com resultados superiores às soluções de trombina pura. Esse resultado revelou que há uma sinergia entre estas moléculas, fato esse que pôde ser constatado pela análise de dicroísmo circular, que demonstrou que a trombina manteve sua estrutura mesmo após o processo de fabricação das membranas, mantendo assim sua atividade, e que o polímero possivelmente atuou como suporte para sua atuação.

Outro ponto positivo a ser levantado é que enquanto a membrana for preservada seca e sob refrigeração, a trombina será mantida ativa, ao contrário de soluções aquosas de trombina que se instabilizam facilmente. Portanto, trata-se de um curativo que estará facilmente disponível, estável e que será ativado no momento que entrar em contato com o local da hemostasia, superando o fato da instabilidade da trombina em soluções aquosas, fato esse já descrito na literatura (HIDEO NISHIMAKI et al., 1992).

5.4. Caracterização biológica

5.4.1. Teste de Viabilidade celular – MTT

Analisar a viabilidade celular se faz importante em qualquer estudo de desenvolvimento de materiais para aplicação na área da saúde. Um material ao entrar em contato com qualquer tecido vivo, não pode ser tóxico e nem gerar subprodutos tóxicos ao organismo. Podendo ocorrer uma geração reativa de espécies de oxigênio, desnaturação proteica, desarranjo mitocondrial e perturbação das funções fagocíticas (JEEVANANDAM et al., 2018).

O PEO já é conhecido por ser biocompatível, e tem sido amplamente estudado para aplicação como biomaterial, isolado ou em associação a outros materiais (NETO; FONSECA; PEREIRA, 2015; WANG et al., 2013a, 2013b). A trombina é uma proteína que já está presente nos indivíduos, portanto não apresenta qualquer toxicidade. Entretanto, quando se misturam materiais diferentes, existe a possibilidade de ocorrência de reação primária ou interações químicas secundárias entre eles, que poderá mudar as características iniciais de cada componente. Isso justifica a necessidade de analisar a toxicidade do novo material.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que não há diferença significativa entre os grupos controle e o que fez uso da membrana de PEO puro e PEO/T2U. Ao contrário, notou-se que as membranas com trombina foram capazes de aumentar a viabilidade celular após 1 h de tratamento, mostrando que o material em questão não apresentou toxicidade às células. Observou-se ainda que o material propiciou um aumento significativo no

número de células viáveis, com destaque para a membrana PEO/T8U (figura 24).



Figura 24 - Viabilidade celular após 1h (a) e após 24h (b) de exposição ao tratamento. (n=6, NS: não significativo, *: p < 0.01, ANOVA - Tukey).

Oliani e colaboradores apresentaram em seu trabalho que, uma amostra só é considerada tóxica quando 50% ou mais das células se tornam inviáveis quando expostas ao tratamento (OLIANI et al., 2017). Desta forma, apesar do resultado obtido em 24 h, não se pode afirmar que o material em questão apresente toxicidade às células em um período prolongado. O fato apresentado na análise em 24h pode estar relacionado ao aumento da densidade celular, com consequente diminuição de substrato para a sobrevivência das células.

Com isso, conclui-se que a viabilidade celular foi estimulada pela trombina em suas diferentes concentrações, e esse efeito pode ser explicado pelo aumento da síntese de DNA e mitose celular, como já demonstrado anteriormente (STOCUM, 2019).

Fonte: A autora

5.4.2. Teste de Viabilidade celular – *Live/Dead*

Foi analisado o efeito citotóxico das membranas de PEO, com e sem trombina, pelo método Live/Dead[®] de imunofluorescência, com resultado apresentado na figura 25.

Nesta análise de viabilidade celular foram utilizados queratinócitos humanos imortalizados (células HaCaT), aonde as células metabolicamente viáveis se apresentam coradas em verde, e as células mortas ou metabolicamente inativas, em vermelho. Os resultados estão apresentados na figura 25, com tempos de exposição aos tratamentos de 1h e 24h.





Fonte: A autora

Observa-se com a análise das imagens que as células se mantiveram viáveis, em sua maioria, independentemente do tipo de tratamento aplicado e do tempo de exposição, pois mostrou uma quantidade significativa maior de células verdes comparada com as células vermelhas. A imagem também nos permite identificar que as células mantiveram sua morfologia, como descrito na literatura para queratinócitos (COLOMBO et al., 2017), não havendo modificação da arquitetura da membrana celular, diminuindo a sensibilidade a apoptose (SPENCER NETTO; FERRAZ, 2001).

É descrito na literatura que a trombina também está associada a apoptose celular (KRENZLIN et al., 2016), justificando o fato de nas maiores concentrações de trombina no material estudado, ter sido observado uma quantidade maior de células inviáveis. Entretanto este fato não fez com que o material fosse considerado tóxico às células, uma vez que a quantidade de células inviáveis se apresentaram em número abaixo de 50% (OLIANI et al., 2017).

Esta análise confirma o resultado apresentado pelo teste de MTT, no qual o material testado não apresentou toxicidade para as células estudadas, independentemente do tempo de exposição.

Resultados semelhantes foram encontrados por Xuan e colaboradores, que produziram microesferas de alginato de cálcio carregados com trombina para atuação com agente hemostático, e ao analisar a toxicidade do material através do ensaio *Live/Dead* encontraram uma viabilidade superior a 90% após 24h de exposição (XUAN et al., 2017).

Na mesma linha, Shi et al (2020) desenvolveram uma estrutura tipo esponja de quitosana e micropartículas de amido carregado com trombina para aplicação na hemostasia, e este compósito não apresentou toxicidade, com viabilidade acima de 80%, após 24h de contato das células com o material (SHI et al., 2020).

Diversos estudos fazendo uso do PEO para aplicação como biomaterial podem ser encontrados na literatura, em muitos desses estudos o teste de *Live/Dead* foi utilizado, encontrando resultados equivalentes aos apresentados aqui nesta pesquisa, ou seja, um número mínimo de células mortas quando comparado às células vivas, após a exposição ao material, comprovando a não toxicidade deste polímero e corroborando com os resultados deste trabalho (REMYA et al., 2018; YUAN et al., 2018; ZHAO et al., 2016).

Mesmo sendo uma análise qualitativa, as porcentagens de células viáveis e inviáveis foram quantificadas, fazendo uso do software Image J, e analisando a significância entre os resultados com método ANOVA e teste de Tukey (figura 26).

Figura 26 - Viabilidade celular após 1h (verde) e após 24h (azul) de exposição ao tratamento. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos nos diferentes tempos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).



Fonte: A autora

A quantidade de células mortas apresentou uma diferença não significativa em quase todos os grupos analisados. Somente entre os grupos PEO/T4U e PEO/T8U apresentaram diferença estatística quando comparados com o controle do mesmo tempo. Da mesma forma, existiu diferença significativa na viabilidade celular entre os mesmos grupos tratados com PEO/T2U e PEO/T8U após 1h e 24h de tratamento. Apesar disso, o número de células viáveis se manteve maior de 50%, mesmo no grupo que apresentou menor viabilidade (PEO/T8U em 1h), corroborando o fato do material não apresentar toxicidade para as células.

5.4.3. Teste de migração celular in vitro

O teste de migração *in vitro* (*Scratch assay*) é uma análise simples, normalmente usada para medir parâmetros básicos de migração celular, como velocidade, persistência e polaridade. As células crescem até confluência e uma fina "ferida" é produzida, arranhando-as com a ponta de uma pipeta. As células na borda da "ferida" polarizam e migram para o espaço da ferida (CORY, 2011).

As feridas foram produzidas com uma ponteira de pipeta nas células em confluência dentro dos poços e, em seguida foram administrados os tratamentos. As imagens obtidas ao longo de 24h, para o acompanhamento do fechamento das "feridas" estão demonstradas na figura 27, com as imagens iniciais e finais do tratamento. **Figura 27 -** Evolução do teste de migração celular, controle, T2U, T4U e T8U, PEO puro, PEO/T2U, PEO/T4U e PEO/T8U nos tempos iniciais e finais.

124



t = 24

125



Fonte: A autora

Observa-se que as feridas tratadas com soluções de trombina apresentaram um fechamento menor do que as que foram tratadas com membranas PEO/trombina, mostrando, mais uma vez que a trombina está presente e ativa nas membranas e que o conjunto atuou em sinergia para favorecer a migração das células.

Esta sinergia provavelmente se deu devido à interação entre os dois compostos, comprovada na análise de DOSY, e pela possível interação entre o polímero e o exosítio II da trombina, não responsável pelas funções da coagulação, deixando livre o exosítio I para atuar na cicatrização (MARAGOUDAKIS; TSOPANOGLOU, 2009), e mantendo assim, a atividade da trombina por mais tempo.

A solução de trombina 2U e a membrana de PEO puro não apresentaram diferenças significativas com o controle, entre 30 e 35% de fechamento, assim como as soluções 4U, 8U e membrana PEO/T2U também não apresentaram diferença significativa entre si, com fechamento na faixa de 45%.

As condições que se destacaram de todas as demais foram as membranas PEO/T4U e PEO/T8U, que apresentaram um fechamento de ferida que ficou entre 65 e 70%, não apresentando diferenças significativas entre si (figura 28 A).

Além de funcionarem como *scaffolds* no crescimento de células, as nanofibras podem carrear algum princípio ativo, e neste teste verificamos que ocorreu exatamente isso. A trombina é expressa nos locais da lesão e desempenha um papel crítico na migração de uma ampla variedade de tipos de células, e o aumento da migração depende da atividade proteolítica da trombina (KARP et al., 2005). Então, ao associar as características cicatrizantes da trombina, com uma estrutura atóxica que oferece um aumento da superfície de contato para que células possam se proliferar criou-se uma situação que favoreceu o crescimento de células.

Na figura 28 B é mostrado o acompanhamento do crescimento das células em todos os tempos analisados, 6, 12, 18 e 24h. Pode-se observar também, que a maioria dos grupos apresentaram um crescimento similar, com exceção dos grupos PEO/T4U e PEO/T8U, que se destacam positivamente após 18h de crescimento.

Figura 28 - Migração celular *in vitro* após 24h de exposição ao tratamento (A) e em 6, 12, 18 e 24h após a exposição ao tratamento (B) (n=4, p < 0.05, ANOVA - Tukey).





Em artigos publicados recentemente, pode-se encontrar este teste para o mesmo polímero utilizado nesta pesquisa. Blendas eletrofiadas de Aloevera/quitosana/PEO foram testadas como *scaffolds* no crescimento de células em 48 h de tratamento, e como resultado obtiveram 32% de fechamento, 24 h após o início e 56% ao final do tratamento (PATHALAMUTHU et al., 2019).

Em outro estudo, foi pesquisado se a trombina pode induzir a secreção de um tipo de citocina que regula a migração e invasão celular durante a gestação. Para isso estudaram a cicatrização, pelo método *scratch assay*, de um tipo de célula encontrada no início da gestação (HTR-8/SVneo). Obtiveram como resultado uma taxa de fechamento de 60% da ferida por atuação da trombina (BRÜNNERT et al., 2019).

Esses estudos mostram que os resultados obtidos com as membranas de PEO/trombina estão dentro do esperado para os materiais analisados.

5.4.4. Teste de cicatrização in vivo

A análise da cicatrização tecidual foi baseada na comparação dos aspectos estruturais e morfométricos após os 2º, 6º e 10º dias da cirurgia, nos diferentes grupos experimentais: grupo controle (C), grupo que fez uso da solução de trombina com concentração 2 UI/mL (soIT2), grupo que fez uso da solução de trombina com concentração 4 UI/mL (soIT4), grupo que fez uso da solução de trombina com concentração 8 UI/mL (soIT8), grupo que fez uso da membrana de PEO puro (PEO puro), grupo que fez uso da membrana de PEO com trombina na concentração 2 UI/mL (PEO/T2U), grupo que fez uso da membrana de PEO com trombina na concentração 4 UI/mL (PEO/T4U) e grupo que fez uso da membrana de PEO com trombina na concentração 8 UI/mL (PEO/T8U).

Foram quantificados macrófagos após o 2º dia da lesão, vasos sanguíneos e espessura do epitélio em todos os dias do estudo, porcentagem de fibras colágenas no 10º dia após a lesão e a reepitelização do local, medida pelo grau de contração da ferida.

Os macrófagos possuem um importante papel no início do processo de cicatrização de uma lesão. Logo no começo da fase inflamatória, são ativados monócitos no sangue que irão se diferenciar em macrófagos no local afetado, estes por sua vez executam múltiplas funções no local da ferida, incluindo desbridamento, indução do crescimento de tecidos e resolução de inflamação (EMING, 2019).

Macrófagos também contribuem para a formação de novos vasos sanguíneos, proliferação de fibroblastos e síntese da matriz extracelular, essenciais na transição para a próxima fase (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014), sendo então compreendido a importância da quantificação deste tipo de célula na região da lesão.

A quantificação dos macrófagos foi realizada apenas no 2º dia após a cirurgia, uma vez que eles serão ativados no início da fase inflamatória, e esta é observada nos primeiros dias após a ocorrência da lesão (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Para tal, foi utilizado o programa Image J, a partir da imagem MERGE, na qual foi contabilizado onde houve marcação do núcleo, em azul, em conjunto com a marcação do citoplasma, em verde, caracterizando a célula completa.

Figura 29 - Imunofluorescência de cortes transversais da área da lesão em pele de dorso de camundongo nos diferentes grupos estudados, no 2º dia após a cirurgia, com o marcador CD 68 de macrófago. Os núcleos estão corados com DAPI (azul) e os citoplasmas estão corados com FITC (verde), MERGE é a sobreposição das imagens. Aumento 10x.



Fonte: A autora

Na análise estrutural, é possível observar um aumento no número de macrófagos após aplicação dos tratamentos em comparação ao controle (figura 29), com destaque para a membrana PEO/T8U, na qual nota-se na imagem sobreposta (MERGE) um número consideravelmente maior de marcações fluorescentes em comparação às outras imagens.

Confirmando as observações das imagens, a análise estatística dos dados obtidos (figura 30) mostra que a membrana de PEO/T8U apresentou uma quantidade significativa maior do número de macrófagos em comparação com o grupo controle e com todos os demais grupos analisados.

Figura 30 - Número total de macrófagos na região da lesão dos diferentes grupos experimentais. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=4, p < 0.05, ANOVA - Tukey).



Fonte: A autora

Tal fato pode ser atribuído à maior concentração de trombina ativa na membrana e apresentar estrutura secundária mais semelhante à trombina pura, como foi demonstrado na análise de dicroísmo circular.

A trombina atua como fator quimiotático e mitogênico para monócitos/macrófagos na área lesionada (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014), justificando o resultado obtido nesta análise, em que a membrana com maior concentração de trombina, apresentou maior quantidade de macrófagos na lesão.

Há de se destacar que houve diferença positiva entre os grupos que fizeram uso da membrana com trombina e os grupos que fizeram uso apenas da solução de trombina, na mesma concentração. Esse fato foi demonstrado para as concentrações de T4U e T8U, mostrando que houve uma sinergia entre as moléculas de PEO e da trombina, que possibilitou aumento da atividade da proteína, como já demonstrado em análises anteriormente discutidas, melhorando o desempenho do curativo desenvolvido.

Após a hemostasia e a fase inflamatória, o processo de reparo tecidual é intensificado na fase proliferativa. Nesse período, o número de células na ferida aumenta, o que está relacionado à migração e proliferação de fibroblastos e células endoteliais, responsáveis por estimular e modular a síntese da matriz extracelular, epitelização e angiogênese (EMING, 2019; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014), sendo que essas duas últimas podem ser vistas na figura 31.

132

Figura 31 - Coloração em Hematoxilina e Eosina de cortes transversais da área da lesão em pele de dorso de camundongo nos diferentes grupos estudados. Destaque para epiderme (asterisco). Aumento 10x. Barra = $100 \mu m$.



Fonte: A autora

Na síntese da matriz extracelular, uma matriz temporária, é substituída pela matriz de colágeno, enriquecida em proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas não colagênicas, o que leva a restaurar a estrutura e a função do tecido adequado (DARBY et al., 2014).

Na epitelização, as células epiteliais que participam do fechamento da superfície da ferida têm origem em suas bordas e nos anexos epiteliais, como folículos capilares, glândulas sudoríparas ou glândulas sebáceas (GUO; DIPIETRO, 2010; ZHAO et al., 2017). A evolução da espessura do epitélio pode ser vista na figura 31, destacado com um asterisco, ao longo dos dias analisados no estudo. É observada a manutenção do epitélio em todos os grupos, com formação de anexos da pele em maior intensidade a partir do 6º dia após a lesão.

A angiogênese é um processo de criação de novos vasos sanguíneos, onde será restaurada a circulação sanguínea no local da lesão, evitando o desenvolvimento de necrose isquêmica, estimulando simultaneamente o processo de reparo tecidual. Além disso, muitos fatores de crescimento secretados por células epiteliais, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, demonstram uma forte atividade pró-angiogênica (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

O estudo estatístico do número de vasos neoformados pode ser observado na figura 32. A quantificação dessas estruturas, a partir de áreas mais vascularizadas (*hot-spot*) (SATO et al., 2019), indicou valores maiores no 6º dia após a lesão em relação ao 2º dia, em praticamente todos os grupos analisados, o que está de acordo com os acontecimentos das fases da cicatrização, pois é na fase proliferativa em que a angiogênese acontece, e esta fase se inicia após alguns dias da lesão ter ocorrido (GUO; DIPIETRO, 2010).

Figura 32 - Número de vasos neoformados na região da lesão dos diferentes grupos experimentais. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).



Fonte: A autora

É possível identificar também que o grupo que fez uso da membrana PEO/T8U apresentou melhor resultado no 6º dia após a lesão, e esse resultado só não foi maior significativamente que o grupo que usou a solução pura de trombina 2 UI/mL. Esse dado se mostra coerente com a análise anterior, a quantificação de macrófagos, uma vez que fatores de crescimento secretados por este tipo de célula apresentam atividade pró-angiogênica (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014). Quando comparado a quantidade de vasos no 2º dia do tratamento para a membrana PEO/T8U com os valores obtidos pelos grupos que usaram a solução de trombina pura de mesma concentração e a membrana de PEO pura, observa-se que a angiogênese se mostrou maior significativamente para o grupo PEO/T8U, mostrando mais uma vez que a associação entre as cadeias do polímero e da proteína se mostrou efetiva.

O mesmo não foi observado para as outras formulações da membrana com trombina, possivelmente devido à mudança na estrutura secundária da proteína, indicado na análise de dicroísmo circular.

A medida da espessura do epitélio foi realizada utilizando o programa Image J e seguindo metodologia descrita na literatura (GARG; MEHROTRA, 2014), onde três medidas (figura 33) de cada imagem foram obtidas para se chegar a uma média da espessura, em μm.

Figura 33 - Medidas da espessura do epitélio (μm) em três pontos (marcações em amarelo).



Fonte: A autora

Os resultados após análise estatística da espessura do epitélio constam na figura 34, onde é possível avaliar que a espessura do epitélio não mostrou diferença significativa entre os grupos nos 6º e 10º dia do estudo, entretanto forneceu valores significativamente maiores para os grupos PEO/T2U e PEO/T8U no 2º dia, em comparação ao controle e aos demais grupos, o que é algo a ser ressaltado, uma vez que a epitelização se dá principalmente na fase proliferativa, que ocorre de maneira sobreposta com o final da fase inflamatória (DARBY et al., 2014). No entanto, vemos que para esses dois grupos o aumento do epitélio foi antecipado, mostrando possivelmente a atuação da trombina associada ao polímero, já que na membrana e nas soluções puras, essa característica não foi observada.

Figura 34 - Espessura do epitélio (μm) na região da lesão dos diferentes grupos experimentais. * - diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).



Fonte: A autora

Pode-se ressaltar que o fato da membrana ser solúvel e realizar a disponibilidade da trombina de forma imediata, e não de forma controlada, pode ter sido o motivo da espessura do epitélio ter apresentado um resultado insatisfatório, principalmente no 10º dia do estudo, já que a trombina possui função de atrair e proliferar macrófagos, que por sua vez são a principal fonte de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a proliferação de fibroblastos e biossíntese de colágeno, que darão suporte para reconstrução do epitélio (OLCZYK; MENCNER; KOMOSINSKA-VASSEV, 2014).

É durante a fase de remodelamento que ocorre a deposição de colágeno de maneira mais organizada, sendo então a característica mais importante da cicatrização (GUO; DIPIETRO, 2010). Analisar a organização e a porcentagem da área ocupada por fibras colágenas possibilita observar o estado de agregação das fibras, que indica uma maturidade desses elementos.

A coloração com Tricômio de Masson, utilizada para identificar as fibras colágenas, coradas em azul, foi realizada apenas com os grupos do 10º dia após a lesão, uma vez que sua deposição de forma organizada ocorre nos momentos finais da cicatrização, como já mencionado anteriormente. Pode-se observar nas imagens (figura 35) que as fibras se apresentaram distribuídas por boa parte do tecido e organizadas paralelamente à epiderme.

Figura 35 - Coloração em Tricômio de Masson de cortes transversais da área da lesão em pele de dorso de camundongo nos diferentes grupos estudados no 10º dia após a lesão. Destaque para fibras colágenas (seta amarela). Aumento 10x.



Fonte: A autora

Para a quantificação das fibras colágenas, foi usado o programa Image J e seguindo a literatura (CHEN; YU; XU, 2017), determinou a porcentagem de colágeno depositado, em relação à área total analisada.

Os resultados após análise estatística constam na figura 36, onde podese verificar que não houve diferença significativa entre os grupos analisados, possivelmente pelo mesmo motivo do resultado da espessura do epitélio, uma vez que a membrana se desfaz em contato com o ferimento, disponibiliza a trombina de forma imediata, fazendo com que os resultados positivos observados estivessem no início do processo de cicatrização.

Figura 36 - Porcentagem de área ocupada por fibras colágenas em relação ao total de reparo na região da lesão dos diferentes grupos experimentais no 10º dia após a lesão (n=4, p < 0.05, ANOVA - Tukey).





Ao longo do experimento, a lesão produzida foi medida fazendo uso de um paquímetro digital e seguindo a literatura (BATISTA et al., 2010) para mensurar a área da ferida, assim como seu grau de contração. Os valores encontrados foram estatisticamente analisados e os resultados podem ser visto na figura 37.

Figura 37 - Grau de contração da ferida dos diferentes grupos experimentais. *
diferença significativa em relação ao controle; # - diferença estatística entre os mesmos tratamentos (n=3, p < 0.05, ANOVA - Tukey).



Fonte: A autora

Os dados nos mostram que houve diferença significativa com relação ao controle e aos demais grupos estudados apenas no grupo PEO/T8U e apenas no 2º dia do estudo. Este dado acompanha outros resultados anteriores para este mesmo grupo, número de macrófagos e espessura do epitélio no 2º dia, indicando que a maior concentração de trombina, unida ao polímero, que fez manter sua atividade após o processo de eletrofiação, fez a diferença para a finalidade a que se propôs o curativo desenvolvido neste trabalho.

Corroborando com este resultado, Ziv-Polat e colaboradores compararam a ação da trombina livre e ligada à nanopartículas de óxido de

ferro III na cicatrização de feridas na epiderme de ratos *Wistar*, e como resultado obteve uma maior contração da ferida após o 3º dia do estudo com a trombina ligada, quando comparado aos outros grupos (ZIV-POLAT et al., 2010).

Não houve diferenças significativas no grau de fechamento das feridas nos 6º e 10º dias após a lesão, e justifica-se pelo fato da trombina ter sido disponibilizada no ferimento imediatamente assim que o curativo é depositado no local, fazendo com que sua atuação se desse apenas no início do processo.

Este resultado, assim como outros que apresentaram esta mesma característica e que foram discutidos anteriormente, justifica a importância de obtermos um dispositivo pouco ou nada solúvel para disponibilização de medicamentos, pois melhores resultados na aplicação em longo prazo podem ser alcançados.

6. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que é possível inserir trombina em uma matriz polimérica eletrofiada, e ainda assim manter sua atividade.

Os dispositivos de PEO/Trombina eletrofiados desenvolvidos nesta pesquisa apresentaram as dimensões esperadas com fibras de diâmetro médio próximo de 200 nm, nas condições de 4,5% de concentração e 1 mL/h de vazão. Tais condições apresentaram características como viscosidade, condutividade elétrica e tensão superficial, que em conjunto, propiciaram a obtenção das membranas com a estrutura esperada.

Análises de FTIR e RMN mostraram que ambas as substâncias, PEO e trombina, estavam presentes nas membranas, confirmando a presença do princípio ativo após o processo de eletrofiação.

O espectro de RMN-Dosy mostrou que a adição de trombina fez com que o coeficiente de difusão do conjunto PEO/trombina fosse menor, quando comparado com a membrana do polímero puro, mostrando haver uma interação entre as cadeias das duas substâncias.

A análise de dicroísmo circular (CD) mostrou que a estrutura secundária da proteína foi mantida após a produção das membranas, justificando a manutenção da atividade da trombina na membrana e sua atuação nas análises de migração e cicatrização.

A análise dinâmico-mecânica, DMA, mostrou que com a adição de trombina houve um aumento nas propriedades mecânicas e na Tg das membranas, possivelmente devido à uma forte interação entre as cadeias de PEO e trombina, atribuída à ligação de Hidrogênio, evidenciada na análise RMN-Dosy.

O resultado da análise em UV-vis mostrou que a atividade da trombina foi mantida, mesmo após um período de 3 meses de armazenamento das membranas sob refrigeração.

Nos ensaios de toxicidade, MTT e *Live/Dead*, o material desenvolvido não apresentou toxicidade às células queratinócitas nos períodos analisados, 1 e 24h. No teste de migração *in vitro* (*Scratch Assay*) as membranas com trombina apresentaram um resultado superior ao controle e às soluções de trombina isolada, com um resultado em torno de 69% para as membranas de 4 e 8 UI/mL, evidenciando sinergia entre PEO e Trombina.

Na cicatrização *in vivo* a membrana contendo trombina na concentração 8 UI/mL apresentou resultados satisfatórios no número de macrófagos e na contração da ferida após dois dias do experimento, bem como maior angiogênese no 6º dia após a lesão. Também foi obtido maior espessura do epitélio nas membranas com 2 e 8 UI/mL no 2º dia após a cirurgia.

A sinergia entre o PEO e a trombina foi essencial para a cicatrização, conforme verificado pela quantificação de macrófagos e angiogênese, e se mostrou superior em relação à trombina isolada.

Resultados insatisfatórios na espessura do epitélio no último dia da análise de cicatrização e da quantificação de fibras colágenas mostraram a necessidade de obter um dispositivo que se mantenha integro ao longo do processo, para que ocorra de fato uma liberação controlada do princípio ativo estudado. Apesar da forte associação PEO/Trombina e da sinergia no trato das
feridas, as membranas se dissolveram e impediram que se obtivesse um modelo de liberação da trombina a longo prazo.

Com base nas análises realizadas, o material apresentou propriedades significativas para ser aplicado no recobrimento de feridas, atuando no início do processo de cicatrização. A membrana estocada a seco e sob refrigeração manteve a atividade da trombina, por tempos mais prolongados em comparação com soluções aquosas. Esse material poderá ser aplicado de forma tópica, funcional e eficaz, proporcionando uma difusão mais efetiva da trombina no local desejado.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Como continuação desta pesquisa, é proposto:

- Realizar análise de fluorescência de Quenching para identificar o tipo de interação entre o PEO e a trombina.
- Desenvolvimento das membranas em coletor rotativo, para obtenção de fibras alinhadas e traçar um comparativo entre os diferentes coletores.
- Fazer reticulação da membrana para diminuir sua solubilidade e analisar a atividade da trombina após mais esse processo.
- A partir de uma membrana não solúvel e com uma trombina ativa, desenvolver a modelagem do processo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIGO, M.; MCARTHUR, S. L.; KINGSHOTT, P. Electrospun nanofibers as dressings for chronic wound care: Advances, challenges, and future prospects.

Macromolecular Bioscience, v. 14, n. 6, p. 772–792, 2014.

ABROSIMOVA, K. V.; SHULENINA, O. V.; PASTON, S. V. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 769, n. 1, 2016.

AHMED, F. E.; LALIA, B. S.; HASHAIKEH, R. A review on electrospinning for membrane fabrication: Challenges and applications. **Desalination**, v. 356, p. 15–30, 2015.

AKBIK, D. et al. Curcumin as a wound healing agent. Life Sciences, v. 116, n. 1, p. 1–7, 2014.

ALCANTAR, N. A.; AYDIL, E. S.; ISRAELACHVILI, J. N. Polyethylene glycolcoated biocompatible surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 51, n. 3, p. 343–351, 2000.

ANDRADE, J. et al. FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. **Lwt**, v. 99, p. 166–172, 2019.

ARENAS, L. A. S.; DE ZURBARAN, C. B. La matriz extracelular: El ecosistema de la célula. **Salud Uninorte**, v. 16, p. 9–18, 2002.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mechanisms involved in wound healing: A revision. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.

BARBOSA, M. T. A.; LIMA, Y. A. Análise temporal da morbidade hospitalar de lesões de pele no Brasil, 2019.

BATISTA, J. S. et al. Evaluation of the Healing Activity of Pequi (Caryocar Coriaceum Wittm) Oil in Cutaneous Wounds ... **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. January 2010, p. 441–447, 2010.

BERLINER, L. J. Thrombin - Structure and Function. [s.l: s.n.].

BODE, W.; TURK, D.; KARSHIKOV, A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of d-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human α-thrombin: Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. **Protein Science**, v. 1, n. 4, p. 426–471, 1992.

BONIFANT, H.; HOLLOWAY, S. A review of the effects of ageing on skin integrity and wound healing. **British Journal of Community Nursing**, v. 24, n. March, p. S28–S33, 2019.

BRÜNNERT, D. et al. Thrombin stimulates gene expression and secretion of IL-11 via protease-activated receptor-1 and regulates extravillous trophoblast cell migration. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 132, n. March, p. 35–41, 2019.

BURGAZ, E. Poly(ethylene-oxide)/clay/silica nanocomposites: Morphology and thermomechanical properties. **Polymer**, v. 52, n. 22, p. 5118–5126, 2011.

BURRIDGE, K. M. et al. Mapping protein–polymer conformations in bioconjugates with atomic precision. **Chemical Science**, v. 11, n. 24, p. 6160–6166, 2020.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CASTRO, K. C.; COSTA, J. M.; MEI, L. H. I. Advances in Electrospinning

Technique in the Manufacturing Process of Nanofibrous Materials. In:

Electrospun Materials and Their Allied Applications. [s.l: s.n.]. p. 379–399. CAVAZANA, W. C. et al. Estudo Comparativo Da Reação Inflamatória De Feridas Tratadas Com Açúcar (Sacarose) E Compostos Com Ácidos Graxos Essenciais , Em Ratos – Estudo Preliminar Comparative Study About the Inflammatory Response of Wounds Treated With Sugar (Sucrose) and Fa. **Medicina**, v. 36, p. 85–90, 2007.

CERA, E. DI. Thrombin Interactions. **Chest**, v. 124, n. 3 SUPPL., p. 18S-25S, 2003.

CHEN, F. et al. Interaction of the synthetic antithrombotic peptide P10 with thrombin: A spectroscopy study. **RSC Advances**, v. 9, n. 32, p. 18498–18505, 2019.

CHEN, Y.; YU, Q.; XU, C. B. A convenient method for quantifying collagen fibers in atherosclerotic lesions by ImageJ software. International Journal of

Clinical and Experimental Medicine, v. 10, n. 10, p. 14904–14910, 2017.

CIOMS. Internacional Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. [s.l: s.n.].

CLEARY, D. B.; TRUMBO, T. A.; MAURER, M. C. Protease-activated receptor 4-like peptides bind to thrombin through an optimized interaction with the enzyme active site surface. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 403, n. 2, p. 179–188, 2002.

COBO, I. et al. Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules. **Nature Materials**, v. 14, n. 2, p. 143–149, 2015a. COBO, I. et al. Smart hybrid materials by conjugation of responsive polymers to biomacromolecules. **Nature Materials**, v. 14, n. 2, p. 143–159, fev. 2015b.

COLOMBO, I. et al. HaCaT Cells as a Reliable in Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. **Mediators** of Inflammation, v. 2017, 2017.

CORY, G. Scratch-Wound Assay. In: Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition. [s.l: s.n.]. v. 769p. 430–435.

COSTA, R. G. F. et al. Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I:

Fundamentação teórica. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012a.

COSTA, R. G. F. et al. Eletrofiação de polímeros em solução II. Aplicação e perspectiva. **Polímeros**, v. 22, p. 178–185, 2012b.

CRESTE, C. F. Z. et al. Highly Effective Fibrin Biopolymer Scaffold for Stem Cells Upgrading Bone Regeneration. **Materials**, v. 13, p. 1–14, 2020.

DADO, D.; LEVENBERG, S. Cell-scaffold mechanical interplay within

engineered tissue. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 6, p. 656–664, 2009.

DARBY, I. A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. Clinical,

Cosmetic and Investigational Dermatology, v. 7, p. 301–311, 2014.

DE MOURA RIBEIRO, M. V. et al. Authenticity of roasted coffee using1H NMR spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 24–30, 2017.

DEITZEL, J. M. et al. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. **Polymer**, v. 42, n. 19, p. 8163–8170, 2001.

DEMIR, M. M. Investigation on glassy skin formation of porous polystyrene fibers electrospun from DMF. **Express Polymer Letters**, v. 4, n. 1, p. 2–8, 2010.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings - a review.

BioMedicine, v. 5, n. 4, p. 24–28, 2015.

DI CERA, E. Thrombin as procoagulant and anticoagulant. Journal of

Thrombosis and Haemostasis, v. 5, n. SUPPL. 1, p. 196–202, 2007.

DI CERA, E. Thrombin. Molecular Aspects of Medicine, v. 29, n. 4, p. 203– 254, 2008.

DIAS, A. L. P.; SILVA, L. D. DA. Perfil do portador de lesão crônica de pele: fundamento a autopercepção de qualidade de vida. **Escola Anna Nery**, v. 10, n. 2, p. 280–285, 2006.

DOS SANTOS, E. S. et al. Assessment of the healing of standardized wounds in rabbits treated serially with autologous platelet-rich plasma gel.

Semina:Ciencias Agrarias, v. 37, n. 6, p. 4131–4138, 2016.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 3, p. 151-, 1995.

EMING, S. A. Introduction to Wound Healing and Tissue Repair. Atlas of

Ulcers in Systemic Sclerosis, p. 39–41, 2019.

EVERLAND, H. et al. Wound Dressing with Thrombin, 2013.

FENTON, J. W.; FASCO, M. J.; STACKROW, A. B. Human Thrombins:

Production, Evaluation, and properties of alpha-thrombin. The Journal of

Biological Chemistry, v. 252, n. 11, p. 3587–3598, 1977.

FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações A cell-based model of coagulation and its implications REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E H E M O T E R A

P I A REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E H E M O T E R. Revista

Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 32, n. 5, p. 416–421, 2010.

FERREIRA, L. E. N. et al. The effect of two drug delivery systems in

ropivacaine cytotoxicity and cytokine release by human keratinocytes and fibroblasts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 161–171, 2017.

FERREIRA, L. E. N. et al. Effects of lidocaine and the inclusion complex with 2hydroxypropyl-β-cyclodextrin on cell viability and proliferation of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 7, p. 874– 882, 2018.

FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O. Terapia por pressão negativa-vácuo Negative pressure therapy - vacuum. **Revista Médica**, v. 89, n. 03–04, p. 142– 146, 2010.

FORATO, L. A. et al. **A Espectroscopia na região do Infravermelho e** algumas aplicações. [s.l: s.n.].

FRIDRIKH, S. V. et al. Controlling the Fiber Diameter during Electrospinning.

Physical Review Letters, v. 90, n. 14, p. 4, 2003.

FROHBERGH, M. E. et al. Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering. Biomaterials, v. 33, n. 36, p. 9167–9178, 2012.

GARG, N.; MEHROTRA, R. Morphometric analysis of epithelial thickness and blood vessels in different grades of oral submucous fibrosis. **Malaysian**

Journal of Pathology, v. 36, n. 3, p. 189–193, 2014.

GAUTAM, S.; DINDA, A. K.; MISHRA, N. C. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1228–1235, 2013.

GUGERELL, A. et al. Thrombin as important factor for cutaneous wound

healing: Comparison of fibrin biomatrices in vitro and in a rat excisional wound healing model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 6, p. 740–748, 2014.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.

HASAN, A. et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 11–25, 2014.

HENG, Z. et al. Simultaneously enhanced tensile strength and fracture toughness of epoxy resins by a poly(ethylene oxide)-block-carboxyl terminated butadiene-acrylonitrile rubber dilock copolymer. **RSC Advances**, v. 5, n. 53, p. 42362–42368, 2015.

HIDEO NISHIMAKI, K. et al. Stable Aqueous Thrombin Solutions, 1992.

HUANG, X. F. et al. A novel chitosan-based sponge coated with self-assembled thrombin/tannic acid multilayer films as a hemostatic dressing. **Chinese**

Journal of Polymer Science (English Edition), v. 33, n. 2, p. 284–290, 2015. HUANG, Y. et al. Structural basis of RGD-hirudin binding to thrombin: Tyr3 and five C-terminal residues are crucial for inhibiting thrombin activity. **BMC**

Structural Biology, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014.

HUANG, Z. M. et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 63, n. 15, p. 2223–2253, 2003.

ISRAELACHVILI, J. The different faces of poly(ethylene glycol). **Proceedings** of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 94, n. 16, p. 8378–8379, 1997. JANSSON, K.; HAEGERSTRAND, A.; KRATZ, G. A biodegradable bovine collagen membrane as a dermal template for human in vivo wound healing. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand**

Surgery, v. 35, n. 4, p. 369–375, 2001.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of**

Nanotechnology, v. 9, n. 1, p. 1050–1074, 2018.

JIN, H. J. et al. Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide).

Biomacromolecules, v. 3, n. 6, p. 1233–1239, 2002.

KARP, J. M. et al. Thrombin mediated migration of osteogenic cells. **Bone**, v. 37, n. 3, p. 337–348, 2005.

KRENZLIN, H. et al. The importance of thrombin in cerebral injury and disease.

International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 1, 2016.

KRSTIĆ, M. et al. Formulation and characterization of nanofibers and films with carvedilol prepared by electrospinning and solution casting method. **European**

Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 101, p. 160–166, 2017.

LAJARRIGE, A. et al. The mixed impact of nanoclays on the apparent diffusion coefficient of additives in biodegradable polymers in contact with food. **Applied Clay Science**, v. 180, n. January, p. 105170, 2019.

LEE, J. et al. Formulation of thrombin-inhibiting hydrogels: Via self-assembly of ionic peptides with peptide-modified polymers. **Soft Matter**, v. 16, n. 15, p. 3762–3768, 2020.

LEMMA, S. M.; BOSSARD, F.; RINAUDO, M. Preparation of pure and stable chitosan nanofibers by electrospinning in the presence of poly(ethylene oxide). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, 2016.

LI, B.; YANG, X. Rutin-loaded cellulose acetate/poly(ethylene oxide) fiber membrane fabricated by electrospinning: A bioactive material. Materials

Science and Engineering C, v. 109, p. 110601, 2020.

LIAO, W. et al. FTIR-ATR detection of proteins and small molecules through

DNA conjugation. Sensors and Actuators, B: Chemical, v. 114, n. 1, p. 445–450, 2006.

LIU, Y. et al. Preparation and characterization of electrospun human hair keratin /poly (ethylene oxide) composite nanofibers. **Revista Materia**, v. 19, n. 4, p. 382–388, 2014.

LOPES, S. T. DOS A. et al. Valores de referência do tempo de protrombina

(TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em cães. Ciência

Rural, v. 35, n. 2, p. 381–384, 2005.

LU, C. et al. Thermal conductivity of electrospinning chain-aligned polyethylene oxide (PEO). **Polymer**, v. 115, p. 52–59, 2017.

MAHONEY, C. et al. Electrospun nanofibers of poly(2-

caprolactone)/depolymerized chitosan for respiratory tissue engineering

applications. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, v. 27, n. 7,

p. 611–625, 2016.

MARAGOUDAKIS, M. E.; TSOPANOGLOU, N. E. Thrombin: Physiology and disease. [s.l.] Springer, 2009.

MICSONAI, A. et al. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra.

Nucleic Acids Research, v. 46, n. W1, p. W315–W322, 2018.

MILES, A. J.; WALLACE, B. A. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. **Chemical Society Reviews**, v. 45, n. 18, p. 4859–4872, 2016.

MUÑIZ, A. R. et al. Use of absorbable hemostatic gelatin sponge in postoperative care of the vascular pedicle of interpolated flaps. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic**

Sugery, v. 32, n. 1, p. 123–127, 2017.

NETO, C. G. DA T.; FONSECA, J. L. C.; PEREIRA, M. R. **PERMEAÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DE MEMBRANAS DE QUITOSANA MODIFICADAS COM POLI (ÓXIDO DE ETILENO)Anais do 7º Congresso Brasileiro de Polímeros**. [s.l: s.n.].

NISTA, S. V. G.; BETTINI, J.; MEI, L. H. I. Coaxial nanofibers of chitosanalginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 222–228, 2015.

OLCZYK, P.; MENCNER, Ł.; KOMOSINSKA-VASSEV, K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. **BioMed**

Research International, p. 1–8, 2014.

OLIANI, W. L. et al. Fabrication of polypropylene/silver nanocomposites for biocidal applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 75, p. 845–853, 2017.

OLIVEIRA, M. F. DE et al. Feridas em membros inferiores em diabéticos e não diabéticos: estudo de sobrevida. **Revista gaucha de enfermagem**, v. 40, p. 1–10, 2019.

PATHALAMUTHU, P. et al. Enhanced performance of Aloe vera incorporated chitosan-polyethylene oxide electrospun wound scaffold produced using novel Spirograph based collector assembly. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 140, p. 808–824, 2019.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: a short

review. Trends Biomater Artif Organs, v. 18, n. 1, p. 18–23, 2004.

PEREIRA, Â. L.; BACHION, M. M. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003.

Revista Brasileira de Enfermagem, v. 58, n. 2, p. 208–213, 2008.

POONGUZHALI, R.; BASHA, S. K.; KUMARI, V. S. Nanostarch Reinforced with Chitosan/Poly (vinyl pyrrolidone) Blend for In Vitro Wound Healing Application.

Polymer - Plastics Technology and Engineering, v. 57, n. 14, p. 1400–1410, 2018.

QIN, Z. YU et al. Fast dissolving oral films for drug delivery prepared from chitosan/pullulan electrospinning nanofibers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 137, p. 224–231, 2019.

RATNA, D.; ABRAHAM, T. N.; KARGER-KOCSIS, J. Studies on Polyethylene Oxide and Phenolic Resin Blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, n. 5, p. 2658–2667, 2008.

RAVINDAR REDDY, M. et al. X-RD, SEM, FT-IR, DSC Studies of Polymer Blend Films of PMMA and PEO. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, p. 3713–3718, 2016.

RAY, S. S. et al. A comprehensive review: Electrospinning technique for fabrication and surface modification of membranes for water treatment

application. **RSC Advances**, v. 6, n. 88, p. 85495–85514, 2016.

REILE, I. et al. DOSY Analysis of Micromolar Analytes: Resolving Dilute Mixtures by SABRE Hyperpolarization. **Angewandte Chemie**, v. 129, n. 31, p. 9302–9305, 2017.

REMYA, K. R. et al. Hybrid polycaprolactone/polyethylene oxide scaffolds with tunable fiber surface morphology, improved hydrophilicity and biodegradability for bone tissue engineering applications. Journal of Biomaterials Science,

Polymer Edition, v. 29, n. 12, p. 1444–1462, 2018.

RIVERA NICHOLLS, A. et al. Thermomechanical characterization of thermoplastic polyimide to improve the chain interaction via crystalline domains.

Polymer Engineering and Science, v. 59, n. 9, p. 1919–1932, 2019.

ROSA, A. S.; DISALVO, E. A.; FRIAS, M. A. Water Behavior at the Phase

Transition of Phospholipid Matrixes Assessed by FTIR Spectroscopy. Journal

of Physical Chemistry B, v. 124, n. 29, p. 6236–6244, 2020.

SANTOS, L. G. et al. Electrospun membranes of poly(lactic acid) (PLA) used as scaffold in drug delivery of extract of sedum dendroideum. **Journal of**

Nanoscience and Nanotechnology, v. 13, n. 7, p. 4694–4702, 2013.

SANTOS, M. DA S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de 1H para análises de formulações farmacêuticas. **Quimica Nova**, v. 36, n. 2, p. 324–330, 2013.

SATO, M. et al. Analysis of Tumor Angiogenesis and Immune Microenvironment in Non-Functional Pituitary Endocrine Tumors. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 5, p. 695, 2019.

SELVAKUMAR, K.; MEENAKSHISUNDARAM, O. Mechanical and dynamic mechanical analysis of jute and human hair-reinforced polymer composites.

Polymer Composites, v. 40, n. 3, p. 1132–1141, 2019.

SHI, Z. et al. Puff pastry-like chitosan/konjac glucomannan matrix with thrombin-occupied microporous starch particles as a composite for hemostasis.

Carbohydrate Polymers, v. 232, p. 115814, 2020.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

SILL, T. J.; VON RECUM, H. A. Electrospun materials for affinity-based engineering and drug delivery. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 646, n. 1, 2015.

SPENCER NETTO, F. A. C.; FERRAZ, E. M. Apoptose, neutrófilos e o cirurgião. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 28, n. 1, p. 56–61, 2001.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Rev. Bras. Cir. Plást**, v. 24, n. 2, p. 212–218, 2009.

VICENTE, C. P. et al. Antithrombotic activity of dermatan sulfate in heparin cofactor II-deficient mice. **Blood Journal**, v. 104, n. 13, p. 3965–3970, 2004. VICENTE, C. P.; HE, L.; TOLLEFSEN, D. M. Accelerated atherogenesis and neointima formation in heparin cofactor II-deficient mice. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4261–4267, 2007.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações

farmacêuticas de polímeros. Polímeros, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, C. et al. Promoting coagulation and activating SMAD3 phosphorylation in wound healing via a dual-release thrombin-hydrogel. **Chemical Engineering Journal**, v. 397, n. January, p. 125414, 2020a.

WANG, K. et al. Electrospun nanofibers and multi-responsive supramolecular assemblies constructed from a pillar[5]arene-based receptor. **Chemical**

Communications, v. 49, n. 89, p. 10528–10530, 2013a.

WANG, K. et al. Surface modification of sepiolite: effects on thermomechanical properties of PP/PA6 blends. **Journal of Polymer Research**, v. 27, n. 2, 2020b.

WANG, Y. et al. Enhanced orientation of PEO polymer chains induced by nanoclays in electrospun PEO/clay composite nanofibers. **Colloid and**

Polymer Science, v. 291, n. 6, p. 1541–1546, 2013b.

WEBBER, M. J. et al. Erratum: Supramolecular nanostructures that mimic VEGF as a strategy for ischemic tissue repair (Proceedings of the National Academy of Sciences (2011) 108, 33 (13438-13443) DOI: 10.1073/

pnas.1016546108). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 23, p. 9220, 2012.

XIE, X. et al. A novel hemostatic sealant composed of gelatin, transglutaminase and thrombin effectively controls liver trauma-induced bleeding in dogs. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 7, p. 983–988, 2013.

XU, S. et al. Novel Anticoagulant Peptide from Lactoferrin Binding Thrombin at the Active Site and Exosite-I. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 3132–3139, 2020.

XUAN, F. et al. Biocompatibility and Effectiveness Evaluation of a New Hemostatic Embolization Agent: Thrombin Loaded Alginate Calcium

Microsphere. BioMed Research International, v. 2017, 2017.

YUAN, T. T. et al. Development of Electrospun Chitosan-Polyethylene

Oxide/Fibrinogen Biocomposite for Potential Wound Healing Applications.

Nanoscale Research Letters, v. 13, 2018.

ZARGHAMI, A. et al. Fabrication of PEO/chitosan/PCL/olive oil nanofibrous scaffolds for wound dressing applications. **Fibers and Polymers**, v. 16, n. 6, p. 1201–1212, 2015.

ZHAO, X. et al. Reactive electrospinning of composite nanofibers of carboxymethyl chitosan cross-linked by alginate dialdehyde with the aid of

polyethylene oxide. Carbohydrate Polymers, v. 148, p. 98–106, 2016.

ZHAO, X. et al. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 122, p. 34–47, 2017.

ZIV-POLAT, O. et al. Enhancement of incisional wound healing by thrombin conjugated iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 741–747, 2010.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Protocolos

Protocolo de inclusão do tecido em parafina

- Álcool 80% 60 min
- Álcool 100% I 60 min
- Álcool 100% II 60 min
- Álcool 100% III 60 min
- Álcool/Xilol -30 min
- Xilol I 60 min
- Xilol II 60 min
- Xilol/parafina 60 min
- Parafina I 60 min
- Parafina II 60 min
- Emblocar

Protocolo coloração em Hematoxilina e Eosina

- Xilol I 10 min
- Xilol II 10 min
- Álcool 100% 5 min
- Álcool 95% 5 min
- Álcool 70% 10 min
- Lavar em água corrente 3 vezes
- Hematoxilina 2 min
- Lavar em água corrente 3 vezes
- Lavar 1 vez com água ácida
- Lavar em água corrente 1 vez
- Eosina 2 min
- Lavar até sair coloração
- Álcool 70% 2 min
- Álcool 95% 2 min
- Álcool 100% 2 min
- Xilol 5 min
- Deixar secar para montagem das lâminas

Protocolo coloração em Tricômio de Masson

- Xilol 5 min
- Álcool100% 10 min
- Álcool 95% 10 min
- Álcool 70% 10 min
- Lavar em água corrente 2 vezes
- Lavar em água destilada
- Deixar secar
- Cobrir tecido reagente A+B proporção 1:1 (kit Tricômio de Masson) 10 min
- Lavar em água corrente e secar
- Cobrir tecido reagente C (kit Tricômio de Masson) 6 min
- Lavar em água destilada rapidamente e secar
- Cobrir tecido reagente D (kit Tricômio de Masson) 4 min
- Lavar em água corrente e secar
- Cobrir tecido reagente E (kit Tricômio de Masson) 5 min
- Secar as lâminas, sem lavar
- Cobrir tecido reagente F (kit Tricômio de Masson) 5 min
- Lavar em água destilada e secar
- Álcool50% 2 min
- Álcool 95% 2 min
- Álcool 100% 2 min
- Xilol I 2 min
- Xilol II 2 min
- Deixar secar para montagem das lâminas

Protocolo anticorpo CD68

- Xilol 5 min
- Álcool 100% 5 min
- Álcool 95% 5 min
- Álcool 50% 5 min
- Água destilada 5 min
- Lavar em PBS 5 min
- PBS BSA 2% 60 min
- PBS overnight
- Anticorpo primário over night
- Lavar PBS 2 vezes 5 min cada
- Anticorpo secundário/FITCH 45 min
- Lavar PBS 2 vezes 5 min cada
- Colocar DAPI 15 min
- Lavar água destilada
- Secar e montar em meio de glicerol

		CEUAUNICAMP	
-	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CERTIFICADO	
	Certificamos que a proposta intitulada <u>Estudo da cicatrização de lesões teciduais utilizando</u>		
	membranas poimericas carregadas com trombina, registrada com o nº 5253-1/2019, sob a		
	responsabilidade de Prot. Dr. Crist	tina Pontes Vicente e Larissa Giorgetti dos Santos, que envolve a	
	produção, manutenção ou utilizaçã	o de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata	
	de LELNº 11 794. DE 8 DE OUTUBBO DE 2008, que estabelese precedimentos estas		
	a LEIN 11.794, DE 6 DE OUTOBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de		
	animais, do DECRETO Nº 6.899, L	DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo	
	Conseino Nacional de Controle d	la Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela	
	Comissão de Etica no Uso de An	imais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP,	
	em reunião de <u>09/05/2019</u> .		
	Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica	
	Vigência do projeto:	01/04/2019 a 01/03/2020	
	Vigência da autorização para	09/05/2019 a 01/03/2020	
	manipulação animal:	Committees instaling (OSTIN) (CI	
	No. de animais:	Camundongo Isogenico / C5/BL/6J	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Sexo:	3 Machos	
	Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J	
	No. de animais:	3	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Espécie / linhagem/ raca:	Camundongo isogênico / C57BL/6J	
	No. de animais:	3	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Sexo:	3 Machos	
	Especie / linnagem/ raça:	Camundongo isogénico / C5/BL/6J	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Sexo:	3 Machos	
	Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J	
	No. de animais:	3	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Espécie / linhagem/ raca:	Camundongo isogênico / C57BL/6J	
	No. de animais:	3	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Sexo:	3 Machos	
	Especie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Sexo:	3 Machos	
	Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J	
	No. de animais:	3	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Espécie / linhagem/ raca:	S Machos Camundongo isogênico / C57BL/61	
	No. de animais:	3	
	Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas	
	Sexo:	3 Machos	
	Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J	

	1
No. de animais:	3
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	3 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	3
Idade/Peso: `	7.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	3 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	3
Idade/Peso:	7.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	3 Machos
Origem:	biotério cemib
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério da Biologia Celular, DBEF, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, <u>18 de junho de 2019</u>.

a 010 Prof. Dr. Wagner José Fávaro Presidente

to

Rosangela dos Santos Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponivel na página da CEUAUNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.