



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO - CTC  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - EQA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIAS INTEGRADAS - InteLab

**DRIELLE JUSTINIANO DE SOUZA**

**INCORPORAÇÃO DE COLÁGENO DE RÃ-TOURO EM  
MEMBRANAS DE NANOCELULOSE VISANDO APLICAÇÃO  
EM MEDICINA REGENERATIVA**

Florianópolis/SC  
Março, 2015



Drielle Justiniano de Souza

**INCORPORAÇÃO DE COLÁGENO DE RÃ-TOURO EM  
MEMBRANAS DE NANOCELULOSE VISANDO APLICAÇÃO  
EM MEDICINA REGENERATIVA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Testa Pezzin.

Florianópolis/SC  
Março, 2015

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

Souza, Drielle Justiniano de

Incorporação de colágeno de rã-touro em membranas de nanocelulose visando aplicação em medicina regenerativa / Drielle Justiniano de Souza / orientador, Luismar Marques Porto/ coorientadora, Ana Paula Testa Pezzin – Florianópolis, SC, 2015.

115 p

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Nanocelulose. 3. Colágeno de rã-touro. 4. Cicatrização. I. Porto, Luismar Marques. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Incorporação de colágeno de rã-touro em membranas de nanocelulose visando aplicação em medicina regenerativa.

Drielle Justiniano de Souza

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 03 de março de 2015.

---

Prof. Dr. Ricardo Antonio Francisco Machado  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Luismar Marques Porto  
Presidente  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Vieira Berti  
Membro interno  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa de Lima Pimenta  
Membro externo  
UFSC

---

Prof. Dr. Júlio C. M. Souza  
Membro externo  
UFSC/CEPID



Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Minha profunda gratidão aos meus pais e à minha irmã, que sempre acreditaram em mim, por todos os seus esforços, para que o meu sonho pudesse se concretizar.

Ao Professor Luismar Marques Porto pela orientação, ensinamentos e amizade. Em especial, à Professora Ana Paula Testa Pezzin, por sua coorientação, amizade e parceria, sempre.

Aos membros da Banca Examinadora, que aceitaram avaliar e contribuir para o aperfeiçoamento do trabalho.

À Karina Cesca, minha grande amiga, companheira e parceira de todas as horas, sejam elas boas ou não; pelas ideias e contribuições desde o início até a conclusão da Dissertação.

À empresária Maria de Lourdes Molarinho Velly, pela parceria e fornecimento de matéria prima para a realização deste trabalho.

Ao Professor César Benfatti, pelas amostras de colágeno bovino gentilmente concedidas.

A todo o Grupo do Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab): Hudson, Andréa, Fernanda Berti, Karina, Guilherme, Julia, Camila, Charles, Samara, Emily, Maikon, Lya, Afonso, Alencar, José Octávio, Fernanda Rotunno, Tuane, Raul, Vinícius, João, Beatriz, Camila Schroeder, Isadora e Elaine, pelos momentos de trabalho e companheirismo. Às colegas Joanna, Isla e Ericka, que já deixaram o laboratório, mas continuam no coração.

Aos inúmeros amigos e familiares que participaram nesta etapa da minha vida, seja direta ou indiretamente. A todas as pessoas que conheci durante o Mestrado; cada uma tem uma importância e lembrança na minha vida. A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

À Cláudia Hack, pelas análises de DSC e TGA, na UNIVILLE. Ao Roger Bello, pelas análises de FTIR realizadas na UDESC. Ao Iaçanã Parisotto pelas análises de temperatura de desnaturação no LCP/UFSC. À Leidiane, pela liofilização de amostras, no PROFI/UFSC. À Eliana de M. Oliveira e ao Américo Cruz, do LCME, pelas análises de MEV e microscopia confocal.

Ao CNPq, à CAPES e à FINEP, pelo apoio financeiro.



“Se você não quer ser esquecido quando morrer, escreva coisas que valham a pena serem lidas ou faça coisas que valham a pena escrever a respeito”.  
(Benjamin Franklin)



## RESUMO

A engenharia tecidual é uma área de pesquisa que objetiva tratar, manter ou reparar tecidos animais. A cicatrização de feridas, em particular, é um assunto de grande interesse. Há uma grande necessidade de se desenvolver materiais curativos, para que se obtenha melhores resultados, comparados aos existentes. Novos biomateriais com capacidade de funcionalização são promissores, como é o caso da combinação de nanocelulose e de colágeno. O objetivo deste trabalho foi extrair, caracterizar e incorporar colágeno extraído de pele de *Rana catesbeiana* (rã-touro) em membranas de nanocelulose, com a finalidade de desenvolver biopolímeros com propriedades aplicáveis à cicatrização de feridas. Foi possível extrair colágeno da pele de rã-touro e quantificar as proteínas totais (214 µg) e a fração de colágeno (172 µg) por grama de pele, ressaltando a quantificação como o diferencial deste trabalho comparado à literatura. O material extraído da pele de rã-touro foi caracterizado quanto ao perfil eletroforético e à temperatura de desnaturação, revelando que o colágeno extraído é do tipo I, com massa molar de 253 kDa e temperatura de desnaturação de 30,08 °C. O biomaterial foi produzido pela incorporação do colágeno em membranas de nanocelulose. As propriedades pretendidas do biopolímero foram caracterizadas quanto à morfologia 2D e 3D, temperatura de transição vítrea e de fusão, estabilidade térmica e quanto aos grupamentos funcionais. As análises 2D e 3D de microestrutura mostraram o entrelaçamento do colágeno nas fibras de nanocelulose quando na forma biopolimérica, enquanto as análises térmicas indicaram que os biopolímeros apresentam estabilidade necessária à aplicação como cobertura de feridas. O colágeno extraído apresentou bandas características de colágeno e as mesmas puderam ser identificadas após a incorporação do mesmo à nanocelulose. A ação do colágeno e do biopolímero na cicatrização *in vitro* foi avaliada. O ensaio de ferida permitiu concluir que o colágeno de rã-touro atua expressivamente, de modo a acelerar o processo de fechamento da ferida, este processo ocorrendo mesmo em baixas concentrações de colágeno. Este trabalho demonstrou que é possível extrair, quantificar e incorporar colágeno de rã-touro em membranas de nanocelulose e que o biopolímero desenvolvido possui as propriedades necessárias à utilização em processos de cicatrização de feridas.

**Palavras-chave:** nanocelulose, colágeno de rã-touro, cicatrização.



# INCORPORATION OF FROG COLLAGEN IN NANOCELLULOSE MEMBRANES AIMING FOR A REGENERATIVE MEDICINE

## ABSTRACT

Tissue engineering is a research area that aims to treat, maintain or repair animal tissues. Wound healing, in particular, is a subject of great interest, and there is an increasing need to develop curative materials displaying better healing properties compared to existing ones. New biomaterials showing capacity for functionalization, such as the combination of nanocellulose and collagen, are promising fields of research in this area. The objective of this study was to extract, characterize and incorporate collagen from the skin of *Rana catesbeiana* (bullfrog) in nanocellulose membranes, in order to develop biopolymers with properties suitable for wound healing. The material extracted from bullfrog skin was quantified as the total protein content (214 µg) and collagen (172 µg) per grams of skin, highlighting the quantification as the differential of this work compared to literature. The obtained collagen was characterized for the electrophoretic profile and denaturation temperature, results indicating that the extracted collagen is type I, with molecular weight of 253 kDa and denaturation temperature of 30.08 °C. The biopolymer was produced by the incorporation of collagen in nanocellulose membranes. The desired properties of the biocomposite were characterized for 2D and 3D morphology, glass transition and melting temperature, thermal stability and for functional groups. The 2D and 3D analysis of microstructure showed interlacing collagen fibers amongst nanocellulose, when in the biopolymeric form. The showed collagen characteristic bands and the same was observed when it was incorporated in the nanocellulose. The wound healing assay showed that the bullfrog collagen shows significantly effect in accelerating the process of wound closure, and that this process occurs even at low collagen concentrations. This work showed that it is possible to extract, quantify and incorporate bullfrog collagen in nanocellulose membranes and that the biopolymer obtained has the properties/functions required for use in wound healing.

**Keywords:** nanocellulose, frog collagen, wound healing.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ANOVA	Acrônimo para " <i>Analysis of Variance</i> ", ou Análise de Variância. É um teste estatístico amplamente difundido entre os analistas, e visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre as médias de dois grupos de dados.
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
COLB	Colágeno bovino
COLR	Colágeno de rã-touro
Da	Dalton ( $1 \text{ Da} = 1,661 \cdot 10^{-24} \text{ g}$ )
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	<i>Derivative Thermogravimetric</i> (Termogravimetria derivada)
EDS	Detector de energia dispersiva/Espectroscopia por Energia Dispersiva
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NC	Nanocelulose
NC/COLB	Nanocelulose e colágeno bovino
NC/COLR	Nanocelulose e colágeno de rã-touro
PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
SFB	Soro Fetal Bovino
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i> (tetrametiletilenodiamina)
TG	<i>Thermogravimetry</i> (Termogravimetria)
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
TGA	<i>Thermogravimetric analysis</i> (Análise termogravimétrica)
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusão
T <sub>máx</sub>	Temperatura máxima de degradação
T <sub>onset</sub>	Temperatura de degradação térmica



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1–Resumo dos produtos baseados em colágeno disponíveis no mercado atual. ....	50
Tabela 2 – Temperatura de desnaturação ( $T_D$ ) de colágeno de rã-touro. ....	73
Tabela 3 – Teor de aminoácidos presentes na pele de rã-touro e de bovinos (resultados expressos em resíduos/1000 resíduos). ....	77
Tabela 4– Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_m$ ) obtidas das curvas de DSC de nanocelulose (NC), colágeno bovino (COLB), colágeno de rã-touro (COLR), nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB) e nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR).....	83
Tabela 5 – Temperatura de degradação térmica ( $T_{onset}$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{máx}$ ) das amostras obtidas por TG. ....	87
Tabela 6 – Dados obtidos dos espectros de FTIR-ATR das amostras de nanocelulose (NC), colágeno de rã-touro (COLR), colágeno bovino (COLB) e membranas de NC/COLR e NC/COLB. ....	89



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principal constituição histológica da pele.....	30
Figura 2 – Descrição dos eventos e etapas do processo cicatricial.....	35
Figura 3 – Membrana de nanocelulose.....	43
Figura 4 – Estrutura do colágeno. ....	46
Figura 5 – Fluxograma geral das metodologias realizadas neste trabalho. .....	61
Figura 6 –Amostra de pele de rã-touro ( <i>Rana catesbeiana</i> ).....	62
Figura 7 – Proteínas totais e massa de colágeno extraída da pele de rã-touro por meio de extração ácida. Resultados expressos em $\mu\text{g/g}$ de pele de rã-touro (média $\pm$ desvio padrão, $n=6$ ). ....	69
Figura 8 – Eletroforese em Gel de SDS-PAGE de colágeno de rã-touro (COLR) extraído. O marcador de proteínas (M) está na coluna à esquerda.....	72
Figura 9 – Temperatura de desnaturação do colágeno de rã-touro.....	73
Figura 10–Incorporação de colágeno de rã-touro por massa de nanocelulose (NC).● representa a porcentagem de incorporação de colágeno nas membranas de NCe ■ representa a quantidade de colágeno incorporado por massa de NC. ....	75
Figura 11– Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de (a) colágeno bovino (COLB) e (b) colágeno de rã-touro (COLR).....	76
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de (a) nanocelulose (NC); (b)nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR) e (c) nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB). 78	
Figura 13 – Imagens obtidas pela microscopia eletrônica confocal para (a) nanocelulose (corada com Calcofluor White), (b), colágeno de rã-touro (corado com Sirius red) e (c) nanocelulose e colágeno (corada com Calcofluor Whitee Sirius red).....	80
Figura 14 – Estrutura química do corante Sirius red. ....	81
Figura 15– Curvas de DSC de nanocelulose (NC), colágeno bovino (COLB), colágeno de rã-touro (COLR), nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB) e nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR).....	82
Figura 16–Curvas TG/DTG para nanocelulose (NC); colágeno bovino (COLB); colágeno de rã-touro (COLR); nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB); e nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR): a) perda de massa (%) (TG) e b) perda de massa (%) /temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )(DTG). ....	86

Figura 17 – Espectros de FTIR-ATR das amostras de nanocelulose (NC), colágeno de rã-touro (COLR), colágeno bovino (COLB) e membranas híbridas de NC/COLR e NC/COLB. ....	89
Figura 18 – Observação representativa da migração de queratinócitos induzidos pela presença de colágeno nas amostras controle e de NC/COLRa (38,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), NC/COLRb (95,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e NC/COLRc (273,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). ....	92
Figura 19 – Taxa de migração de queratinócitos correspondente à NC, NC/COLRa (38,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), NC/COLRb (95,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e NC/COLBc (273,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). (As letras iguais apresentam significância diferente de $p<0,005$ ). ....	92
Figura 20– Observação representativa da migração de queratinócitos induzidos pela presença de colágeno nas amostras controle e de COLBa (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLBb (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLBb (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRa (38,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRb (95,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e COLRc (273,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). ....	93
Figura 21 – Taxa de migração de queratinócitos correspondente ao controle, COLBa (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLBb (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) COLBc (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRa (38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRb (95 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) COLBc (273 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). (As letras iguais apresentam significância diferente de $p<0,005$ ). ....	93

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1	PERGUNTAS DE PESQUISA .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
3.1	PELE .....	29
3.2	CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS .....	31
<b>3.2.1</b>	<b>Etapas do processo de cicatrização de feridas</b> .....	<b>33</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Ensaio de migração celular</b> .....	<b>37</b>
3.3	ENGENHARIA TECIDUAL E BIOMATERIAIS .....	38
<b>3.3.1</b>	<b><i>Tipos de Biomateriais</i></b> .....	<b>40</b>
3.4	NANOCELULOSE .....	42
3.5	COLÁGENO.....	45
<b>3.5.1</b>	<b>Produtos comerciais à base de colágeno</b> .....	<b>50</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Colágeno de fontes alternativas</b> .....	<b>53</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Colágeno de rã-touro</b> .....	<b>55</b>
3.6	ESTADO DA ARTE E RELEVÂNCIA DO TRABALHO..	57
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>61</b>
4.1	ORIGEM DO COLÁGENO .....	61
4.2	EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DE RÃ-TOURO.....	62
<b>4.2.1</b>	<b>Extração do colágeno de rã-touro</b> .....	<b>62</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Quantificação de proteínas totais pelo Método de Lowry</b> .....	<b>62</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Quantificação de colágeno de rã-touro por Sirius red</b> .	<b>63</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Caracterização do colágeno de rã-touro por SDS-PAGE</b> .....	<b>63</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno de rã-touro</b> .....	<b>64</b>
4.3	PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE E COLÁGENO DE RÃ-TOURO .....	65
<b>4.3.1</b>	<b>Produção das membranas de nanocelulose</b> .....	<b>65</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Incorporação de colágeno nas membranas de nanocelulose</b> .....	<b>65</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Caracterização das membranas de nanocelulose e colágeno de rã-touro</b> .....	<b>66</b>
<b>4.3.3.1</b>	<b><i>Avaliação da morfologia dos biomateriais</i></b> .....	<b>66</b>

4.3.3.2	<i>Temperatura de transição vítrea e de fusão dos biomateriais</i>	66
4.3.3.3	<i>Estabilidade térmica dos biomateriais</i>	67
4.3.3.4	<i>Caracterização dos grupamentos funcionais dos biomateriais</i>	67
4.4	EFEITO DO COLÁGENO NA MIGRAÇÃO E INVASÃO DE QUERATINÓCITOS	67
4.4.1	<b>Linhagem celular</b>	67
4.4.2	<b>Ensaio de migração celular</b>	68
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	69
5.1	EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DE RÃ-TOURO	69
5.1.1	<b>Caracterização do colágeno de rã-touro por SDS-PAGE</b>	71
5.1.2	<b>Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno de rã-touro</b>	73
5.2	PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE E COLÁGENO DE RÃ-TOURO	74
5.2.1	<b>Incorporação de colágeno nas membranas de nanocelulose</b>	74
5.2.2	<b>Caracterização das membranas de nanocelulose e colágeno de rã-touro</b>	76
5.2.2.1	<i>Análise da morfologia dos biomateriais – MEV e confocal</i>	76
5.2.2.2	<i>Temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão dos biomateriais</i>	82
5.2.2.3	<i>Estabilidade térmica dos biomateriais</i>	83
5.2.2.4	<i>Caracterização dos grupamentos funcionais dos biomateriais</i>	88
5.3	EFEITO DO COLÁGENO NA MIGRAÇÃO E INVASÃO DE QUERATINÓCITOS	91
5.3.1	<b>Ensaio de migração celular</b>	91
6	<b>CONCLUSÕES</b>	97
	<b>REFERÊNCIAS</b>	99
	<b>APÊNDICE A – CURVA-PADRÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE LOWRY.</b>	111
	<b>APÊNDICE B – CURVA-PADRÃO DE QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO POR SIRIUS RED.</b>	113

# 1 INTRODUÇÃO

O uso de biomateriais e a engenharia tecidual têm crescido expressivamente na tentativa de atender às necessidades da área biomédica. Um dos materiais biopoliméricos mais utilizados é o colágeno, a proteína mais abundante no corpo humano e na pele. Além disto, apresenta boa compatibilidade comparado a outros polímeros naturais, sendo facilmente absorvível pelo corpo; é altamente hidrofílico e desempenha um papel importante na formação tecidual e de órgãos (Lee; Singla; Lee, 2001; Li *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2012).

Para fins industriais, as principais fontes colágenas estão limitadas aos de animais terrestres, como bovinos e suínos. No entanto, o surto de febre aftosa, encefalopatia espongiiforme bovina e encefalopatia espongiiforme transmissível resultaram em apreensão entre os usuários de produtos derivados de colágeno de origem animal terrestre. Além disso, em certas localidades, o colágeno extraído de fontes porcinas não pode ser usado como um componente de alguns alimentos, devido a restrições religiosas. Desta forma, fontes alternativas de colágeno com riscos menores e que sejam acessíveis têm sido estudadas (Yan *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2012).

A rã, como a maioria dos anfíbios, apresenta grande variedade de substâncias químicas no muco secretado pelas glândulas epidérmicas, as quais vêm sendo estudadas pela indústria farmacêutica para a fabricação de antibióticos e outros medicamentos, constituindo-se num novo objeto de estudo. A rã-touro é um animal ectotérmico, ou seja, seu metabolismo é dependente da temperatura ambiente. Além disso, a pele é fonte de colágeno, sendo utilizada ainda como um tecido regenerativo no tratamento de queimados (Ferreira *et al.*, 2006; Qian *et al.*, 2007).

A associação de colágeno com outros biomateriais é necessária para reforçar as propriedades físicas, químicas e biológicas, melhorar a estabilidade do sistema e, por exemplo, aprimorar os perfis de liberação de compostos incorporados (Ma *et al.*, 2003; Powell e Boyce, 2006).

A funcionalização da nanocelulose (NC) com materiais inorgânicos ou poliméricos abre novos caminhos para o desenvolvimento de biomateriais multifuncionais com expectativas de desempenho promissoras. A NC é utilizada como matriz na preparação de biomateriais funcionais, os quais combinam as propriedades da NC

com as exibidas pelos nanomateriais orgânicos ou inorgânicos típicos (Pedroso, 2009; Hu *et al.*, 2014).

O polissacarídeo celulose é um biopolímero normalmente obtido de plantas, considerado como matéria prima sustentável e praticamente inexaurível. O interesse por recursos renováveis que possam ser utilizados no desenvolvimento de produtos inovadores à ciência, à medicina e à tecnologia ocasionou um renascimento da pesquisa interdisciplinar na área de celulose nos últimos anos, aumentando sua investigação e utilização (Salvi, 2010).

A NC, por sua vez, é um material altamente poroso, que permite o carregamento e a transferência de macromoléculas, ao mesmo tempo em que serve como barreira física eficaz contra qualquer infecção externa. É essa mesma característica microestrutural que possibilita a incorporação de colágeno em sua rede de nanofibras. Geralmente, a NC é produzida em meio estático na forma de uma membrana gelatinosa na interface entre o ar e o meio de cultura. Considerada como um polímero natural inovador, possibilita a combinação eficiente das importantes e bem conhecidas qualidades da celulose vegetal com as características únicas dos nanomateriais (Hu; Catchmark; Vogler, 2013).

A vantagem de se utilizar a NC reside em sua alta pureza e cristalinidade, fibrilas finas com elevada área de superfície, alta resistência mecânica e capacidade de retenção de água. Este biopolímero tem potencial para ser usado como biomaterial comercial devido à sua biocompatibilidade, promoção da cicatrização de feridas, moldabilidade *in situ* e produção de baixo custo (Hong *et al.*, 2006; Salvi, 2010; Hu; Catchmark; Vogler, 2013).

Esta dissertação descreve a extração, a quantificação e a caracterização de colágeno extraído da pele de rã-touro, bem como o desenvolvimento de novos biopolímeros constituídos de nanocelulose e colágeno de rã-touro com a finalidade de aplicação em medicina regenerativa, engenharia tecidual e/ou cosmética.

## 1.1 PERGUNTAS DE PESQUISA

- ✓ É possível utilizar colágeno de rã-touro como um substituto do colágeno bovino?
- ✓ A presença de colágeno de rã-touro acelera o processo de cicatrização de feridas?

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi obter, caracterizar e incorporar colágeno extraído da pele de *Rana catesbeiana* em membranas de nanocelulose visando obter biomateriais aplicáveis à medicina regenerativa, no que diz respeito à cicatrização de feridas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Extrair, quantificar o teor de colágeno e de proteínas totais e caracterizar quanto à massa molar e à temperatura de desnaturação o colágeno da pele de rã-touro.
- ✓ Obter coberturas estruturalmente formadas por nanocelulose sintetizada por *Komagataeibacter hansenii* e colágeno de rã-touro, a fim de produzir biomateriais com propriedades (térmicas, físicas e químicas) necessárias à aplicação em cicatrização de feridas.
- ✓ Avaliar a ação do colágeno na cicatrização de feridas.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo, que constitui uma interface de reparação e renovação entre o corpo e o ambiente, proporcionando uma barreira eficaz contra a invasão microbiana e possuindo as propriedades de proteção contra danos mecânicos, químicos, osmóticos, térmicos e fotolesão. Ela tem a capacidade de adsorção e de excreção, e é seletivamente permeável a determinadas substâncias químicas. Também possui boas propriedades de fricção, auxiliando a locomoção e a manipulação por sua textura (Chai *et al.*, 2010). Além disto, é um tecido relativamente mole, mas capaz de resistir a grandes tensões de corte.

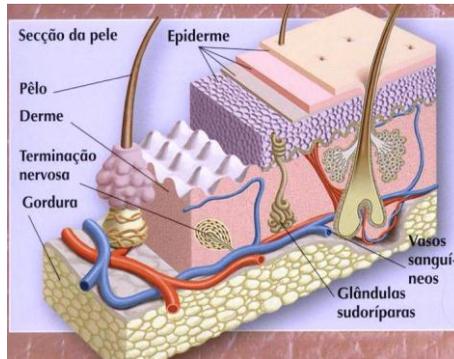
O trauma para a pele pode ser classificado em vários graus, sendo que o menos prejudicial refere-se a danos na camada córnea de epiderme (a mais superficial), na qual a cicatrização de feridas ocorre através da reepitelização, sem enxerto. Os traumas mais graves podem levar a danos parciais ou completos tanto por via cutânea quanto subcutânea. A derme subjacente à epiderme fornece a força física e a flexibilidade à pele, sendo a matriz que suporta a vascularização extensa, sistema linfático e feixes nervosos (Moraes, 2013).

A derme é constituída de 80% de água, fibras de elastina e de colágeno tipo I organizadas em uma rede fibrilar. Os fibroblastos produzem e mantêm a maior parte desta matriz. As células endoteliais revestem os vasos sanguíneos e desempenham um papel crítico no sistema imune da pele, controlando o extravasamento de leucócitos. Uma rede de fibras nervosas se estende por toda a derme, servindo como função sensorial na pele, as quais também secretam neuropeptídeos, influenciando as respostas imunitárias e inflamatórias na pele por meio do seu efeito sobre as células endoteliais, leucócitos e queratinócitos (Chong *et al.*, 2007).

Os queratinócitos (ou corneócitos) são as células mais comuns presentes na epiderme e formam uma barreira na superfície prevenindo a entrada de bactérias e a perda de eletrólitos e de fluido. Em contraste com a epiderme, a derme não só provê a energia e a nutrição à epiderme, mas também atua na termorregulação e na cicatrização cutânea. A espessura da derme varia e pode ser de 10 a 40 vezes mais espessa que a epiderme (0,04 – 1,6 mm), conforme a área no corpo. A derme também contém a rede vascular e os receptores sensitivos de toque, de

temperatura e de dor (Neel *et al.*, 2013). A Figura 1 apresenta os principais constituintes histológicos da pele quando ocorre uma secção.

Figura 1 – Principal constituição histológica da pele.



O fibroblasto é a célula mais comum do tecido conjuntivo, e é responsável pela síntese das fibras colágenas e elásticas, como também pelo material intercelular amorfo. A forma ativa do fibroblasto apresenta prolongamentos citoplasmáticos irregulares; o seu núcleo tem uma forma ovóide, e o seu citoplasma é basófilo devido à intensa atividade de síntese proteica. A forma inativa chama-se fibrócito; é uma célula fusiforme de menor tamanho e com ínfimos prolongamentos, com núcleo alongado e um citoplasma acidófilo. Na cicatrização, os fibrócitos são estimulados pelas citocinas e assumem a forma ativa. Eles se dividem por mitose, e migram por quimiotaxia ao local traumatizado, onde estimulam a síntese colágena e de citocinas, a fim de formar o novo tecido conjuntivo fibroso característico cicatricial (Reis, 2008).

A pele é a estrutura anatômica mais lesada do corpo. Quando traumatizada, o tecido conjuntivo está exposto e uma série de acontecimentos celulares e bioquímicos locais são acionados para restaurar a integridade tecidual. Essa sequência de eventos é denominada cicatrização. Vários estudos têm demonstrado o efeito tópico de medicamentos em uma ferida, como antibióticos, associação de um antibiótico com aminoácidos, anti-inflamatórios para diminuir o tempo cicatricial e evitar infecções e danos estéticos. Apesar de ser frequentemente investigada, a cicatrização continua a desafiar os pesquisadores (Lima *et al.*, 2009; Fong, 2010).

A perda extensa ou grave da pele aciona o mecanismo para a cicatrização de feridas, o que é essencial à sobrevivência. Os objetivos da cicatrização são a recuperação da função biológica e estrutural da pele e a eliminação da formação de tecido de cicatriz. Os esforços têm sido direcionados para encontrar um substituto de pele adequado na criação de uma barreira protetiva, bem como para administrar compostos terapêuticos durante o processo cicatricial (Lin *et al.*, 2011).

Durante o processo de cicatrização, curativos e coberturas são usados para a regeneração e a reparação de tecidos dérmicos e epidérmicos. Vários produtos, como gazes, hidrogéis, espumas, hidrocoloides, alginato, colágeno, celulose, algodão, películas transparentes, entre outros, são recomendados como coberturas para feridas e queimaduras, pela sua influência na resposta celular local (Isaac *et al.*, 2012a).

As lesões por queimadura são uma das lesões físicas mais complexas e dolorosas para tratar e controlar. Uma grande queimadura deixa o paciente com cicatrizes físicas e psicológicas, além da dor e do desconforto. Uma queimadura pode ser definida como uma condição que resulta da ação direta ou indireta de calor. O tratamento de queimaduras pode ser realizado utilizando vários fármacos isoladamente ou associados. O uso de micropartículas de polímeros biodegradáveis com uma superfície áspera é uma abordagem promissora à cicatrização de feridas porque aderem melhor à pele queimada, aumentando desse modo a superfície de contato e permitindo uma melhor liberação dos componentes da formulação na área lesionada (Huang *et al.*, 2014).

Muangman e colaboradores (2011) citam que os tipos de queimaduras podem ser de primeiro, segundo ou terceiro grau. O primeiro grau atinge somente a epiderme. O segundo, envolve a epiderme e parte da camada da derme; e é subcategorizada em parcial ou profunda. As de terceiro grau se estendem por toda a camada dérmica e afeta alguns dos tecidos abaixo da pele. As feridas são úmidas porque a epiderme perde a função de barreira. A dor e o vermelhidão aparecem devido à presença de nervos e vasos sanguíneos na derme.

### 3.2 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Anualmente, estima-se que em torno de 1 milhão de pessoas sejam acometidas por algum tipo de queimadura no Brasil, das quais

duzentas mil são atendidas em serviços de emergência e quarenta mil demandam hospitalização (Tavares e Hora, 2011).

Os acidentes por queimaduras estão entre as principais causas externas de morte registradas no país, perdendo apenas para os acidentes automobilísticos e homicídios. As lesões por causas externas constituem, portanto, a terceira causa de morte no Brasil; entretanto, ainda não se dispõe de um sistema eficiente de centralização de dados relativo à queimaduras, embora as estatísticas revelem a gravidade das lesões. Os gastos com hospitalização das vítimas de queimaduras no Brasil são exorbitantes e chega a ser considerado incalculável. Cerca de oitenta mil pessoas sofrem acidentes por queimaduras em ambiente domiciliar, e os líquidos superaquecidos ou combustíveis são os principais agentes causadores. O álcool colabora com cerca de 20% dos casos por líquidos combustíveis, por se tratar de um produto de fácil acesso, de baixo custo e sem restrição de compra. A água quente é o principal vilão em se tratando de líquido superaquecido, contribuindo para a maioria dos casos em crianças (Tavares e Hora, 2011).

Moraes (2013) cita que 3% da população brasileira é portadora de alguma lesão cutânea crônica. Cerca de 2,7% têm úlceras crônicas nos pés e pernas, porcentagem que chega a 10% nos diabéticos e que representa a segunda causa de afastamento do trabalho no país. A respeito dos resultados de pesquisas e em função dos escassos registros existentes, provavelmente os dados estatísticos não retratam de forma fidedigna o sério problema de saúde pública que são as feridas crônicas.

São muitos os curativos disponíveis para feridas e queimaduras. O mercado produz mais de dois mil tipos diferentes, que são encontrados nas mais variadas formas, desde a simples cobertura com gazes, soluções antissépticas até os mais complexos, as chamadas coberturas inteligentes. Se por um lado tal diversidade de opções é um fator altamente positivo, por outro, pode tornar altamente desafiadora a decisão quanto à melhor escolha do produto para a fase em que se encontra o processo cicatricial da lesão. Os produtos para o tratamento de feridas podem ser divididos em dois grandes grupos: agentes tópicos e curativos. O agente tópico é aquele aplicado diretamente sobre o leito da ferida, ou destinados à limpeza ou proteção da área ao seu redor. O curativo ou cobertura é o recurso que cobre um ferimento, com o objetivo de protegê-lo contra agressões externas, mantendo-o úmido e preservando a integridade de sua região periférica. O curativo ideal

ainda não surgiu, porém existem diretrizes definidas, que orientam sua escolha (Yaguishita, 2006).

O processo cicatricial depende da reconstrução da integridade física e mecânica cutânea. Este processo dinâmico envolve diferentes tipos celulares, como fibroblastos e células inflamatórias, endoteliais e epidérmicas. Para uma cicatrização de feridas rápida e completa, são requeridos curativos apropriados, como substitutos de pele. Os do tipo autoenxerto (transplante de um indivíduo para si mesmo) são mais frequentemente usados, mas oferecem limitações de áreas doadoras. Já os aloenxertos (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, mas, da mesma espécie) podem ser obtidos em abundância, porém, oferecem alto risco de rejeição e de transmissão de doenças. E os do tipo xenoenxerto (transplante entre indivíduos de espécies diferentes), geralmente têm alto custo e baixa resistência mecânica. O objetivo atual é a utilização de biomateriais de baixo custo e que atendam às características necessárias na substituição cutânea (Rezzazade Bazaz *et al.*, 2013; Gautam *et al.*, 2014).

Existem três grandes direções em que a pesquisa voltada à cicatrização de feridas tem como objetivo atualmente: (a) a melhoria em elementos que podem, potencialmente, acelerar a cicatrização e reduzir cicatrizes, (b) o desenvolvimento de novos substitutos de pele como equivalentes de pele e (c) a identificação de sinais que desencadeiam o processo de cicatrização, regeneração em vez de reparação (formação de cicatriz) (Guo e Dipietro, 2010).

O conjunto de propriedades exigentes a serem cumpridas para que um material curativo seja eficiente no tratamento de feridas se baseia em fornecer cobertura simples e próxima; permitir a liberação fácil e indolor de medicamentos; absorver exsudato durante a fase inflamatória; reduzir a dor durante o tratamento; ativar a introdução/transferência de medicamentos; fornecer barreira contra infecções; possuir alta resistência mecânica, elasticidade e moldabilidade; criar e manter um ambiente úmido; ser durável e de baixo custo; ser atóxico e biocompatível (Guo e Dipietro, 2010; Moraes, 2013; Moura *et al.*, 2013; Mogosanu e Grumezescu, 2014).

### **3.2.1 Etapas do processo de cicatrização de feridas**

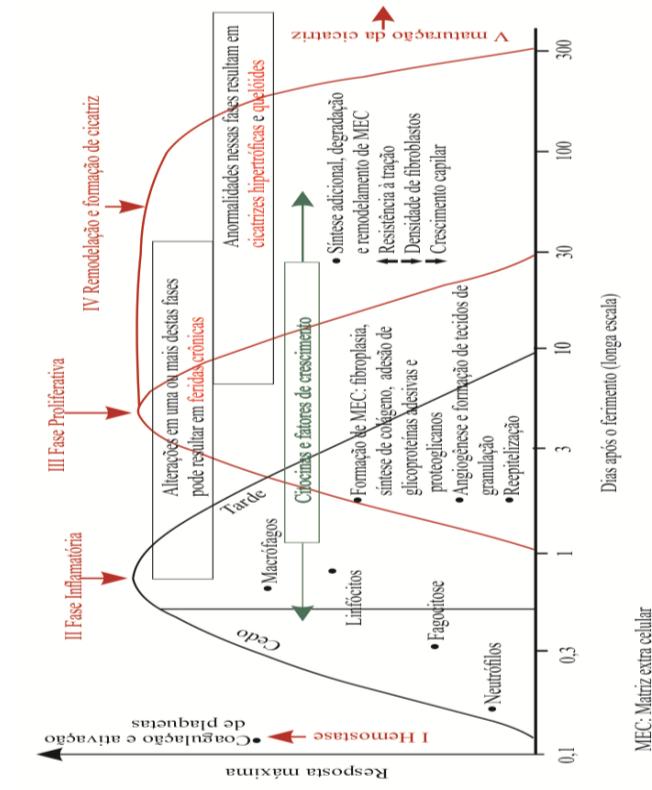
O processo de cicatrização de feridas da pele tem sido estudado há décadas, haja vista que é um processo complexo envolvendo a

formação de um coágulo, uma resposta inflamatória, o acúmulo de tecido de granulação, bem como a deposição e a remodelação da matriz extracelular (MEC). Ele também requer a interação celular da epiderme e da derme, bem como mediadores liberados pelas células inflamatórias, fibroblastos e queratinócitos. Após o início da resposta inflamatória, os fibroblastos começam a proliferar e migrar para dentro da área da ferida. O colágeno e a fibronectina são subsequentemente depositados no leito da ferida, que serve como uma matriz provisória, na qual os queratinócitos podem migrar. Esta reepitelização, conseguida pela migração e mitose celular na epiderme próxima à margem da ferida, é um evento central na cicatrização. Durante todo o processo, as células migram frequentemente como grupos. Os muitos fatores que influenciam a cicatrização incluem citocinas, fatores de crescimento, metaloproteinases, proteínas da MEC, e a aplicação exógena de alguns destes fatores tem sido demonstrada ser benéfica ao processo de cura (Matsuura *et al.*, 2007; Fong, 2010).

O minucioso processo de reparo tecidual ocorre para que seja retomada a estrutura anatômica e funcional da pele depois de submetida a uma ferida. As fases do reparo devem acontecer de maneira eficaz e ordenada (Eming *et al.*, 2007), a fim de evitar complicações como, por exemplo, a produção exacerbada de colágeno que leva à formação de cicatriz hipertrófica (Moraes, 2013).

A Figura 2 apresenta as fases da cicatrização de feridas, de modo que contemple todos os eventos importantes, relacionando os dias após o ferimento e a resposta máxima corresponde à etapa determinada.

Figura 2 – Descrição dos eventos e etapas do processo cicatricial.



Fonte: adaptada de Gurtner e colaboradores (2008).

Ao ser submetido a uma lesão na pele, o organismo responde com a inflamação (Pereira e Bártolo, 2014). Ocorrendo a ruptura de vasos sanguíneos, há um extravasamento de sangue (ou apenas de plasma) às áreas próximas, o que impede maior perda sanguínea (Moraes, 2013). Imediatamente, ocorre a contração dos vasos lesados (vasoconstricção), o que leva a uma aderência e agregação das plaquetas no local lesionado, ativando a cascata de coagulação. A formação do coágulo tem por objetivo limitar a perda sanguínea e fornecer uma matriz preliminar que será a base para o posterior reparo do tecido (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007). Com a ativação de macrófagos na ferida e a síntese de

fatores de crescimento específicos, a MEC começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico (Paul, 2011).

Na ferida em processo de cura, os fibroblastos são recrutados das margens da ferida e induzidos a sintetizar o colágeno, num processo chamado de fibroplasia (Paul, 2011). Ocorre uma neovascularização concorrentemente à fibroplasia, de modo que os novos capilares brotam dos tecidos viáveis na borda da ferida, migrando até esta região. A contração da ferida faz com que suas margens se aproximem e a reepitelização começa a cobrir a superfície tecidual (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007). O tecido de granulação é um leito denso de macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados, suportados pela matriz de fibronectina e colágeno.

O tecido de granulação começa a ser formado por volta do 4º dia após a lesão e, nesta etapa, os novos fibroblastos acumulados misturam-se à neoformações de capilares, dando início ao tecido granular (Pereira e Bártolo, 2014). A MEC, formada por plaquetas, macrófagos, constituintes plasmáticos e fibroblastos, proporciona um meio para a aderência, migração e orientação celular, formadores do tecido de granulação em desenvolvimento. Quando observadas a olho nu, as superfícies da ferida parecem conter muitos grânulos vermelhos que, na verdade, são as extremidades das alças dos novos capilares, que avançam perpendicularmente em relação à superfície. Tipicamente, o tecido tem uma cor vermelho-escura e sangra com facilidade (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007).

Com o crescimento dos fibroblastos a partir das margens da ferida, ocorre simultaneamente a angiogênese, mediada principalmente pelos macrófagos. As células endoteliais no interior dos capilares intactos nas margens migram na direção da ferida, utilizando como substrato a MEC ali presente, diferenciando-se para formar novos tubos capilares (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007; Isaac, *et al.*, 2012a).

A remodelagem da cicatriz envolve a contínua produção, digestão, agregação e orientação das fibras colágenas. É mantido um equilíbrio entre a síntese e a degradação de colágeno realizada pela enzima collagenase, para que não ocorra fibrose. A princípio, o depósito de colágeno acontece de forma desordenada, deixando a cicatriz pouco resistente à tração. À medida que ocorre a remodelagem, as fibras ficam orientadas paralelamente às forças aplicadas sobre a cicatriz. A característica mais relevante da remodelagem é a deposição de colágeno

de forma organizada, considerada a mais importante clinicamente (Campos; Borges-Branco; Groth, 2007; Ferreira e Paula, 2013).

O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele. Com o tempo, o colágeno inicial (tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso (tipo I) é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Estas mudanças aumentam a resistência mecânica da ferida. A reorganização da nova matriz é um processo importante, quando os fibroblastos e os leucócitos secretam collagenase promotora da lise da matriz antiga. Esta etapa, em equilíbrio com a síntese da nova matriz, promove a cicatrização completa e obtida com sucesso (Chithra; Sajithlal; Chandrakasan, 1998; Gomathi *et al.*, 2003).

A cura da ferida tem por final a fase de maturação e a remodelagem da MEC (Paul, 2011). É durante essa fase que a cicatriz adquire a sua máxima resistência fisiológica, mas esse processo é consideravelmente lento, variando de meses até anos. Ainda assim, uma cicatriz cutânea madura tem apenas 70% da resistência mecânica da pele normal. Esta resistência se deve ao acúmulo de colágeno e, com menor influência, mas não menos importante, à remodelagem das fibras colágenas, de modo que sejam formados feixes maiores dessas proteínas, com maior número de ligações covalentes transversais entre as fibrilas (Reis, 2008).

Para que ocorra a cura de uma ferida, existe uma complexa interação de células, fatores de crescimento, componentes da MEC e oxigênio, existindo, entre esses componentes, relações dinâmicas e frequentemente recíprocas (Gopinath *et al.*, 2004). Qualquer debilidade em algum desses componentes é determinante para um processo de formação cicatricial deficiente (Wang *et al.*, 2012).

### **3.2.2 Ensaio de migração celular**

O ensaio de migração celular, também conhecido como ensaio de fechamento de ferida ou *scratch* é bastante utilizado para testes *in vitro*, por ser simples e econômico. Este método é baseado na observação de que, após a criação de uma fenda em uma monocamada de células confluentes, estas se moverão ao local vazio, até que o contato célula-célula seja estabelecido novamente. Os passos envolvem: a criação de uma fenda em monocamada celular, a captura das imagens no início (tempo zero) e após 24 e 48 h, como também a comparação das imagens

para determinar a taxa de migração celular. Uma vantagem deste método é que ele mimetiza a migração celular *in vivo* (Liang; Park; Guan, 2007).

O ensaio de fechamento de ferida tem sido utilizado há décadas para estudar as principais vias de transdução de sinalização na cicatrização e examinar os diversos mecanismos responsáveis pelo movimento das camadas celulares. A configuração mais comumente utilizada é realizada por desnudar uma área de uma camada celular confluyente por meio de uma pequena ferramenta (por exemplo, ponta de pipeta). O método é simples, mas pode resultar em riscos que variam significativamente entre os experimentos. Porém, o método é apropriado ao estudo de interações entre a célula e o material (Fong, 2010).

Tochio e colaboradores (2010) citam que a migração dos queratinócitos é um dos mais importantes fenômenos que ocorre durante o processo cicatricial da epiderme, e há uma grande quantidade de estudos *in vivo* e *in vitro* sobre o seu mecanismo. Além disso, a migração dos queratinócitos é regulada por vários fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento placentário (PGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), que afetam a proliferação, a diferenciação, e a adesão de queratinócitos. No entanto, o mecanismo de migração de queratinócitos ainda permanece incerto.

### 3.3 ENGENHARIA TECIDUAL E BIOMATERIAIS

A engenharia tecidual se refere a um “campo interdisciplinar emergente que reúne os princípios das ciências da vida e da medicina com as da engenharia, oferecendo nova perspectiva no tratamento de reparação, manutenção ou construção de órgãos danificados ou doentes” (George; Onodera; Miyata, 2008; Oliveira *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da área de engenharia de tecidos, visando à cura e regeneração dos tecidos biológicos e à produção de tecidos artificiais necessita diretamente da produção de novos materiais. Estes devem possuir alta biocompatibilidade e as técnicas de cultivo e análise de células nas estruturas tridimensionais (3D) complexas que formam os tecidos devem ser aprimoradas (Fu *et al.*, 2012).

A definição de biomateriais vem sofrendo mudanças em função do avanço das pesquisas na área. A definição adotada na *Cocensus Conference of the European Society for Biomaterials* caracteriza um biomaterial como todo material não vivo usado em dispositivo médico,

ou biomédico, objetivando interação com o sistema biológico (Williams, 1987). Em consonância com essa consideração, em seu artigo de revisão mais recente, Williams (2009) sugere uma definição mais refinada que é apresentada como: "Um biomaterial é uma substância desenvolvida em uma forma definida que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, através do controle das interações com os componentes vivos, em seres humanos ou na medicina veterinária". Desta forma, são considerados como biomateriais todos os materiais de origem natural ou sintética que interagem em contato com tecidos vivos, a fim de direcionar, complementar ou substituir as funções dos organismos vivos, minimizando os efeitos indesejáveis ou rejeição. Para isso, a natureza do material é crítica para criar as condições desejadas para a formação tecidual (Bet *et al.*, 2003).

Para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos, há a necessidade fundamental do estudo das interações entre as células e estes materiais, para que haja segurança e eficiência no uso dos mesmos (Oliveira, 2009).

As células são as unidades-chave para a regeneração e a reparação tecidual, uma vez que elas possuem a extensa proliferação e a capacidade de multiplicação, a sinalização célula-célula, a produção de biomoléculas e a formação da MEC. Além disto, quando cultivadas em uma matriz 3D semelhante aos órgãos e tecidos (*in vitro*), comportam-se similarmente quando *in vivo* (George *et al.*, 2008).

As características de superfície têm um papel vital no desempenho *in vivo* de biomateriais. Os materiais poliméricos nem sempre possuem a bioatividade (propriedade inerente dos materiais de participarem em reações biológicas específicas) necessária para promover uma interação celular adequada, objetivando os métodos na melhoria necessária da biocompatibilidade. O controle da adesão celular sobre o substrato polimérico, no que tange à capacidade de orientar a proliferação, a migração e a diferenciação, é altamente desejável e um ponto central no desenvolvimento de *scaffolds* na engenharia tecidual (Pértile *et al.*, 2010 *apud* Lucchesi *et al.*, 2008).

Um *scaffold* pode ser produzido a partir de materiais naturais e sintéticos com arquitetura e tamanhos de poros variados. Os *scaffolds* são destinados a fornecer: I) suporte mecânico à substituição e/ou regeneração tecidual; II) ambiente favorável à migração, integração, proliferação e diferenciação celular e ao efeito terapêutico desejado; e

III) construção permeável que permita a transferência eficiente de nutrientes e resíduos. Observa-se que quando a estrutura do *scaffold* é produzida em nanoescala, a ligação celular, a proliferação e a expressão de componentes da MEC é aumentada; além de apresentar maior área de superfície à adsorção proteica e mais sítios de ligação aos receptores de membrana celular (Backdahl *et al.*, 2008; Guo; Glavas; Albertsson, 2013; Hayashi *et al.*, 2012; Jithendra *et al.*, 2013; Keira *et al.*, 2004).

Apesar de muitos avanços na engenharia tecidual, os cientistas ainda enfrentam desafios significativos na melhoria da qualidade de vida das pessoas. Os tratamentos terapêuticos convencionais direcionados à reconstrução de tecidos e/ou órgãos lesados têm algumas limitações, como as limitações dos doadores e as rejeições de enxerto. Para atender a todos os requisitos necessários ao sucesso destas abordagens, a escolha do polímero, o *design* das matrizes e o conhecimento dos fatores que afetam as interações das células com os tecidos deve ser investigado (Faleiro *et al.*, 2009; Martins, 2010).

Muitos trabalhos de pesquisa sobre as propriedades de materiais recentemente desenvolvidos se baseiam nas misturas de polímeros naturais e sintéticos, os quais são passíveis de imitar adequadamente o tecido humano devido às suas propriedades biológicas, mecânicas e químicas. Estas misturas tem o potencial de serem transformadas em membranas de diálise, curativos, pele artificial e dispositivos implantáveis para a administração de compostos bioativos. Hidrogéis ou polímeros com elevado teor de água (> 99%) formam outra classe importante de biomateriais que tem sido extensivamente estudada devido à sua natureza 3D, biocompatibilidade e versatilidade no processamento (Sionkowska; Skopinska-Wisniewska; Wisniewski, 2011; Heck, 2012).

### **3.3.1 Tipos de Biomateriais**

Os hidrogéis são desenvolvidos não apenas para interagir com o corpo em ambiente clínico e promover a cicatrização natural, mas também para sondar as interações intercelulares. Estes evoluíram a partir de implantes estáticos e dispositivos para entrega de drogas e plataformas de cultura celular (Kirschner e Anseth, 2013).

Os hidrogéis são redes poliméricas reticuladas contendo grupos hidrofílicos que interagem com a água, com uso relatado desde os anos 1960 e muito antes dos conceitos de engenharia tecidual serem

consolidados (Estcourt; Ramshaw; Ramsay, 1998). Estas aplicações iniciais dizem respeito ao encapsulamento celular, à cura e à proteção de feridas contra agentes externos, devido à permeabilidade ao oxigênio e ao elevado teor de água.

Os hidrogéis utilizados em aplicações regenerativas podem ser baseados em polímeros derivados naturalmente (amido, alginato, colágeno, quitosana, ácido hialurônico e celulose) ou sinteticamente (poli-ácido láctico, poli-ácido glicólico e policaprolactona). Os hidrogéis naturais são geralmente considerados como tendo produtos de biodegradação favoráveis em comparação aos sintéticos, já que os produtos de degradação são tipicamente aminoácidos ou sacarídeos, por serem derivados de mamíferos, crustáceos, plantas e bactérias. A diversidade e a flexibilidade de hidrogéis naturais e sintéticos torna impossível considerar cada tipo, o que vem impulsionando a associação entre os mesmos (Kim e Evans, 2012).

Como alguns requisitos principais, o hidrogel aplicável em cicatrização de feridas tem de ser: permeável ao oxigênio para evitar necrose do tecido recém-formado e do restante; capaz de reter a umidade no local da lesão para promover a cura; compatível com agentes terapêuticos, incluindo agentes antimicrobianos, esteroides e fatores de crescimento; não apresentar citotoxicidade; capaz de estimular a resposta celular, com a formação de cicatriz subsequente (Estcourt; Ramshaw; Ramsay, 1998; Liu *et al.*, 2013).

Os polímeros derivados naturalmente oferecem propriedades interessantes de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Uma das vantagens destes é o reconhecimento biológico que pode apoiar positivamente a adesão e a função celular. No entanto, muitos possuem propriedades mecânicas pobres e são limitados quanto ao fornecimento, o que aumenta o custo do biomaterial (Okamoto e John, 2013).

Os polímeros naturais têm atraído muita atenção devido aos efeitos da poluição ambiental de polímeros sintéticos e os recursos petrolíferos limitados (Shoda e Sugano, 2005). Devido à sua excelente biocompatibilidade, estes materiais têm sido amplamente usados em aplicações biomédicas, incluindo suturas cirúrgicas, dispositivos de fixação óssea, enxertos vasculares, pele artificial, sistemas de distribuição de drogas, sistemas de entrega de genes, aplicações de diagnóstico e de engenharia de tecidos.

Os polímeros são escolhidos com base nas suas propriedades intrínsecas, tais como as propriedades mecânicas e térmicas, a interação

química com o solvente e as suas propriedades biológicas adequadas às aplicações. O colágeno é conhecido por ser o material natural mais promissor e tem encontrado várias aplicações em engenharia tecidual, devido às suas excelentes biocompatibilidade e biodegradabilidade. Todavia, o aumento da biodegradação e a baixa resistência mecânica limitam a utilização deste material. A mistura com outro polímero natural é um método eficaz a fim de modificar a velocidade de biodegradação e otimizar as propriedades mecânicas (Jithendra *et al.*, 2013; Balan e Verestiuc, 2014).

Conforme definição da Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA), a maioria dos materiais de uso em saúde são enquadrados como biomateriais, tais como: próteses, lentes de contato, implantes, *stents*, cateteres, tubos de circulação extracorpórea e *scaffolds* empregados na engenharia tecidual. Os biomateriais podem ser selecionados entre o grupo dos metais, das cerâmicas e dos polímeros, buscando-se os que possuam estrutura física semelhante à dos tecidos. Foi criado um quarto grupo de biomateriais, os compósitos, que consiste na associação de dois ou mais componentes com o objetivo de melhorar as características físico-químicas destes, para que ocorra uma melhor interação com os tecidos (Queiroz, 2012; Miao e Hamad, 2013).

### 3.4 NANOCELULOSE

A nanocelulose (NC) (Figura 3), rede 3D de nanofibras também conhecida como celulose bacteriana (CB), é um polissacarídeo extracelular produzido por diversas bactérias dos gêneros *Agrobacter*, *Komagataibacter*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, entre outros, sob forma de um hidrogel. Geralmente, a celulose é produzida em meio estático na forma de uma membrana gelatinosa na interface entre o ar e o meio. Todavia, algumas linhagens têm mostrado a capacidade de produzir estruturas de celulose na forma de esferas e *cocoons*, quando em cultura agitada (Hu; Catchmark; Vogler, 2013; Recouvreur *et al.*, 2011; Velmurugan; Rao; Nair, 2013).

Figura 3 – Membrana de nanocelulose.



Composta por unidades de glicose unidas por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  glicosídicas, a NC apresenta alta pureza e transparência, assim como boa permeabilidade, resistência à degradação e biocompatibilidade. Em virtude da sua peculiar estrutura, representa um suporte macromolecular adequado à incorporação de fármacos e outras substâncias e à orientação de células (Petersen e Gatenholm, 2011).

A NC tem o potencial de ser usada como um biomaterial comercial pela sua moldabilidade *in situ*, bem como pela sua produção relativamente eficiente em termos de custo. Além disso, a NC pode ser esterilizada com segurança, sem qualquer alteração da sua estrutura e propriedades (Wu *et al.*, 2014). Devido às suas singulares propriedades, a NC desperta grande interesse tanto comercialmente quanto cientificamente em várias áreas, mas principalmente na área biomédica (Almeida *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2006; Moraes, 2013).

Comparada à das plantas, a celulose sintetizada por microrganismos apresenta algumas vantagens, como: a independência de condições regionais e climáticas; o controle da taxa de crescimento dos microrganismos, a fim de produzir a quantidade desejada em tempo determinado; a possibilidade de modificação genética que acentue certas características; e a economia na energia utilizada para a purificação, uma vez que não contém lignina e outros contaminantes (Pértile *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2014).

Devido à funcionalização da NC com materiais inorgânicos ou poliméricos, esta é considerada como um biomaterial ambientalmente correto e atraente no desenvolvimento de produtos de alto valor agregado que propiciam performances promissoras. Estes materiais podem otimizar as propriedades antibacterianas, óticas, elétricas e magnéticas, bem como a atividade catalítica e biomédica (Hu *et al.*, 2014). A biocompatibilidade da NC e seus derivados está bem

estabelecida. A boa correspondência das suas propriedades mecânicas com as de tecidos moles e duros tem sido demonstrada. Modelos de celulose fibrosos são candidatos atrativos ao uso como estruturas de suporte ou para a realização de cultura celular e para a engenharia de reparação tecidual (Muller *et al.*, 2006).

A NC tem sido sugerida como um material com funções de *scaffold* na engenharia tecidual porque: 1) suporta o crescimento e a aderência celular; 2) tem resistência mecânica e estabilidade suficientes para manter sua estrutura durante o cultivo celular; 3) os poros interligados permitem a difusão; 4) não é degradada por células animais e 5) apresenta alta biocompatibilidade (Faleiro *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2014).

A investigação sobre a biocompatibilidade da NC é realizada por meio de testes clínicos, testes em animais e cultura celular. Alguns estudos com seres humanos demonstram que as membranas de NC não causam quaisquer reações cutâneas. Usando queratinócitos humanos na determinação da interação direta da celulose com as células não foram observados efeitos citotóxicos (Klemm *et al.*, 2006).

Diversas aplicações da NC na área biomédica têm sido relatadas, como: pele artificial em humanos com queimaduras extensivas; vasos sanguíneos artificiais para microcirurgias; *scaffolds* para engenharia tecidual de cartilagem e curativos (Shi *et al.*, 2014).

No que tange à cicatrização de feridas, a NC é capaz de criar e manter um ambiente úmido na ferida; fornecer cobertura fácil da ferida, devido à semitransparência; permitir a introdução ou a transferência de fármacos na ferida; absorver o exsudato durante a fase inflamatória; apresentar elevada resistência mecânica, elasticidade e moldabilidade; e permitir a cicatrização rápida e indolor. A empresa brasileira Biofill® (Curitiba, PR) investiga as propriedades da NC na cicatrização, e desenvolveu os produtos, Bioprocess e Gengiflex, como curativos para feridas extensas (Wei; Yang, Hong, 2011). Uma preparação de celulose bacteriana, Prima Cel<sup>TM</sup>, produzida pela Xylos Corporation (Pensilvânia, EUA), foi aplicada em ensaios clínicos na cicatrização de úlceras e feridas (Chawla *et al.*, 2009; Wang; Zhu; Du, 2011).

A arquitetura nanofibrilar da NC apresenta certas semelhanças com os componentes da MEC, principalmente o colágeno. Ambos são muitas vezes as estruturas de suporte mecânico primárias para seus respectivos tecidos de origem. As fibras de colágeno e celulose são semelhantes em tamanho e são montadas a partir de moléculas

precursoras extracelularmente em cadeias poliméricas. Em aplicações biomédicas, a NC está sendo investigada para usos similares aos de colágeno, tais como matrizes celulares (Backdahl *et al.*, 2008; Wang; Zhu; Du, 2011).

O estudo clínico de Muangman e colaboradores (2011) foi baseado na utilização de membranas de celulose em um caso de queimadura superficial. Foi relatado que a membrana adere bem à ferida e não são necessárias ataduras ou bandagens. Além disto, durante o tratamento, o paciente não apresentou qualquer reação alérgica e não foi apresentada nenhuma evidência de presença bacteriana na ferida.

Osman e colaboradores (2007) utilizaram membrana de celulose aplicada como cobertura em 133 pacientes com queimaduras de segundo grau. Concluíram que, pelas suas características, a membrana foi eficaz para recobrir lesões de pele de pouca profundidade em regiões com pouca mobilidade; foi de fácil aplicação e permitiu o reconhecimento de hematomas e/ou infecções por ser uma película semitransparente; reduziu em 30% o custo do tratamento e favoreceu o retorno precoce do paciente às suas atividades. Outros pacientes foram tratados em regime ambulatorial e os resultados mostraram que a celulose foi efetiva na proteção da ferida do meio externo, diminuição da perda de água e eletrólitos e prevenção de infecção. Aplicada sobre a ferida, a membrana adere totalmente à lesão em 48 horas, funcionando como substituta temporária da pele. O material possui pequenos poros, suficientes para impedir a entrada bacteriana, mas grandes para que o tecido respire, filtrando totalmente os raios ultravioleta. E, tal qual a pele, tem permeabilidade mínima para líquidos, evitando o processo de desidratação e perda de sais minerais comuns nos queimados. A cobertura não precisa ser trocada, o que, no caso de queimaduras graves é vantajoso, porque a troca retira parte do tecido recém-formado, em um procedimento doloroso, que geralmente exige anestesia geral. A membrana de celulose protege o tecido enquanto o organismo renova a pele. Quando a cicatrização é concluída, a membrana resseca e cai naturalmente.

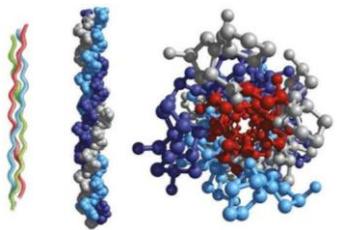
### 3.5 COLÁGENO

Atualmente, são conhecidos 29 tipos de colágeno, os quais se diferenciam na composição de aminoácidos, nos domínios de cada molécula e nos diferentes arranjos estruturais. O mais comumente

encontrado e conhecido química e estruturalmente é o do tipo I, o qual é formado por duas cadeias idênticas chamadas  $\alpha 1$  e uma cadeia diferente  $\alpha 2$ . O aumento da temperatura resulta em alterações estruturais do colágeno, acarretando mudanças nas propriedades físicas. Isto porque, a partir de certa temperatura ocorre a destruição da estrutura 3D da tripla hélice do tropocolágeno (unidade monomérica colágena), provocando a sua desnaturação e produzindo uma estrutura desorganizada, a gelatina. Para o colágeno tipo I, a formação de fibras ocorre em pH 7, sendo este o pH onde se tem a máxima interação eletrostática entre as moléculas de tropocolágeno, fazendo com que a resultante de cargas na molécula seja zero (colágeno nativo) (Pedroso, 2009).

O colágeno é único em seus diferentes níveis de ordem estrutural: primário, secundário, terciário e quaternário (Figura 4). *In vivo*, as moléculas de colágeno formam fibras com uma orientação interna e estrutural específica e reforçado por dois tipos de reticulação covalente (intramolecular e intermolecular). A reticulação intermolecular é essencial à formação de fibras poliméricas e, conseqüentemente, para a sua estabilidade mecânica e outras características físicas. Os biomateriais produzidos a partir de colágeno oferecem várias vantagens: eles são biocompatíveis e atóxicos e têm bem documentadas as propriedades imunológicas, biológicas, químicas, físicas e estruturais. Além disto, pode ser degradado em compostos fisiologicamente toleráveis ao corpo humano (Ruszczak, 2003; Khan *et al.*, 2009).

Figura 4 – Estrutura do colágeno.



Fonte: adaptada de Nelson e Cox (2000).

O colágeno é composto por três cadeias polipeptídicas com tripla hélice de tamanho similar. Cada cadeia contém cerca de 1000 resíduos de aminoácidos de tamanho e tem um comprimento médio de 300 nm e diâmetro de 1,4 nm. O colágeno tem uma sequência primária repetitiva,

das quais cada terceiro resíduo é glicina (Gli). A sequência da cadeia polipeptídica pode ser descrita como Gli-XY, em que X e Y são, geralmente, prolina e hidroxiprolina formando uma super-hélice esquerda com as outras duas cadeias (Sionkowska; Skopinska-Wisniewska; Wisniewski, *et al.*, 2009; Aberoumand, 2012).

Nas décadas de 1970 e 1980, a expansão da aplicação médica de biomateriais e a pesquisa do tecido conjuntivo desafiava e orientava os cientistas a focar os estudos no colágeno, ao passo que a tecnologia e os processos de obtenção do mesmo eram facilitados e aperfeiçoados, com novos produtos à base de colágeno surgindo no mercado (Friess, 1998).

O colágeno é um polímero natural amplamente utilizado em aplicações médicas, pois é encontrado naturalmente em todo o corpo, proporcionando biocompatibilidade inerente. Além disto, este material é versátil e pode ser fabricado em matriz porosa, filme de dupla camada, microesfera e hidrogel, incluindo a função de entrega de drogas e células a fim de regenerar tecidos. Especificamente, o colágeno é responsável por cerca de 30% das proteínas totais dos corpos dos vertebrados. Em tecidos conjuntivos, como ligamentos e tendões, mais de 90% das proteínas extracelulares consistem de colágeno. Os principais benefícios e vantagens deste incluem a sua disponibilidade, acessibilidade e custo-benefício, além de proporcionar biocompatibilidade por meio da ligação e crescimento celular. Recentemente, *scaffolds* constituídos de colágeno associado a outros polímeros naturais foram produzidos como um biomaterial bioativo aprimorado (Chung; Jakus; Shah, 2013).

Na área da engenharia tecidual, os substitutos de pele são capazes de gerar uma maior expansão da área superficial da pele do doador do que pelos métodos convencionais. O colágeno é comumente usado como *scaffold* devido às suas muitas propriedades vantajosas, incluindo baixa antigenicidade e aumento da adesão, proliferação e função celular, criando um ambiente extracelular natural importante à comunicação celular e formação de camada (Zhijiang e Guang, 2011).

Sendo um biomaterial importante com aplicações difundidas em diversas áreas, destaca-se o uso de colágeno como sutura cirúrgica, cosmético e na cicatrização. Este apresenta características desejáveis para aplicações como nutriente essencial biológico, inocuidade à saúde humana e capacidade de retenção de água. Comparado à gelatina, o colágeno tem menor peso molecular e uma melhor absorção e biodegradabilidade (Shoda e Sugano, 2005).

Souza (2013) relatou que as membranas de colágeno podem sofrer ações enzimáticas decorrente da presença de proteases, fazendo com que seja rapidamente reabsorvidas pelo organismo. Estas membranas têm sido empregadas a fim de melhorar o reparo cicatricial de danos mecânicos e químicos da derme, com ampla utilização no campo médico e farmacológico, haja vista a promoção da maturação da ferida pelo fornecimento de um suporte para uma transição mais rápida à produção do colágeno maduro e seu alinhamento.

Infelizmente, as propriedades mecânicas pobres e as taxas de degradação rápida de *scaffolds* de colágeno podem causar instabilidade do enxerto e manuseio difícil. Além do seu comportamento mecânico desfavorável, estes materiais têm heterogeneidade inerente devido à variabilidade na origem e nas condições de processamento, o que torna o controle de qualidade de tais *scaffolds* problemático. As altas taxas de degradação e as propriedades mecânicas deficientes de colágeno muitas vezes não atendem às exigências de aplicações específicas e, com isto, limitam o uso de *scaffolds* à base de colágeno (Powell e Boyce, 2006).

Os biomateriais à base de colágeno podem se originar de duas técnicas fundamentais: quando uma matriz colágena é descelularizada e preserva a forma do tecido original e a estrutura da MEC, que não garante um material totalmente livre de remanescentes celulares; ou quando ocorre uma extração colágena a partir de tecidos biológicos, utilizando a solubilização por ácidos, por enzimas ou por sais neutros (Vulcani, 2004). As proteínas provenientes de fontes animais devem ser purificadas para garantir a sua segurança em aplicações biomédicas (Santos *et al.*, 2013).

A literatura sobre os métodos de extração (ácida, enzimática ou por sais neutros) e sua influência sobre o rendimento e a qualidade do colágeno extraído são limitadas, já que os autores apenas comparam os valores obtidos ao final. A precipitação seletiva de sal assegura a recuperação dos tipos de colágeno individuais que podem estar presentes em extratos de vários tecidos. As moléculas de colágeno do tipo I exibem precipitabilidade seletiva de vários solventes. Segundo Friess (1998), a extração ácida é mais eficaz que a por adição de sal, porém, a união dos dois métodos proporciona maior rendimento final. Isto é possível pela capacidade do sal neutro de solubilizar e remover outras proteínas e polissacarídeos. A desvantagem é a necessidade de realização de uma diálise eficiente ao fim do processo.

O colágeno é insolúvel em solventes orgânicos. Os solventes mais utilizados são o ácido acético diluído ou solução salina neutra (NaCl). O ácido acético é utilizado para extrair moléculas de colágeno reticuladas presentes na pele do animal. O material extraído é purificado por precipitação, centrifugação e diálise. Os métodos utilizados para o isolamento de colágeno a partir de peles de bovinos não são suficientemente eficazes para o isolamento a partir de peles de anfíbios e peixes (Aberoumand, 2012).

Skierka e Sadowska (2007) estudaram a influência de diferentes ácidos e pepsina na extração de colágeno píceo e concluíram que o ácido acético é um dos melhores solventes, principalmente na concentração de 0,5 M. Cheng e colaboradores (2009) confirmaram estas conclusões para a extração de colágeno de galinhas. A solubilidade de colágeno em ácido acético pode afetar a extração. A concentração do ácido acético pode alterar o valor de pH da extração em massa. É bem conhecido que o valor do pH pode regular a densidade de carga da proteína que modifica a interação eletrostática e a estrutura das proteínas. Um rendimento relativamente mais elevado foi obtido perto da concentração de 0,5 M no estudo de Wang e colaboradores (2008).

O estudo de Oliveira, Soares e Rocha (2010) relata o caso clínico de um paciente diabético e hipertenso, portador de ferida isquêmica, tratado com cobertura não convencional, à base de *Aloe vera* e colágeno. A coleta de dados foi efetuada através de exame físico do paciente, utilizando-se um instrumento com dados relativos às condições do paciente e da lesão, bem como através do registro fotográfico da mesma. Os curativos foram realizados diariamente e, ao final de dez semanas, observou-se a total cicatrização. Não foram observados desconfortos ou complicações decorrentes do uso do produto, concluindo-se que o mesmo apresentou eficácia terapêutica para este caso em particular.

Nozaki e colaboradores (2012) avaliaram a citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. Ma e colaboradores (2003) produziram *scaffolds* porosos para engenharia tecidual por meio da liofilização da mistura de soluções de colágeno e quitosana. A observação pela microscopia confocal confirmou a distribuição uniforme destes dois materiais constituintes do *scaffold*.

Lesiak-Cyganowska e colaboradores (2006) demonstraram que quando são semeados fibroblastos e queratinócitos em colágeno xenogênico, obtém-se um produto similar à pele humana, ou seja, as

células (7-10 dias de cultura) começaram a criar membranas basais, as quais foram confirmadas por testes imunocitológicos.

O estudo de Isaac e colaboradores (2011) teve como objetivo avaliar e quantificar o potencial papel dos queratinócitos na contração da ferida, utilizando um modelo *in vitro* e um modelo pré-definido de contração de gel de colágeno povoado com fibroblastos.

O objetivo do estudo de Isaac e colaboradores (2012b) foi avaliar o comportamento histológico de queratinócitos e fibroblastos humanos cultivados sobre uma matriz de colágeno porcino derivada da submucosa intestinal, usada como matriz de sustentação dessas células. Foi observado que os fibroblastos, quando semeados sobre a matriz, migraram para o seu interior, povoando a rede de colágeno e os queratinócitos, quando semeados sobre a matriz de colágeno, organizaram-se em camada estratificada. A análise histológica foi realizada com hematoxilina-eosina e *Sirius red*.

### 3.5.1 Produtos comerciais à base de colágeno

Nesta seção, apresenta-se a Tabela 1 com alguns produtos baseados em colágenos de origens distintas, visando a utilização na cicatrização de feridas, comercialmente disponíveis na atualidade. Estes dados são relevantes para a importância do desenvolvimento de novos produtos, que possuam características iguais ou superiores às já existentes, ambientalmente correto e de baixo custo.

Tabela 1–Resumo dos produtos baseados em colágeno disponíveis no mercado atual.

<b>AlloDerm™</b> (Nova Jérsei, Estados Unidos)	Matriz tecidual acelular, que otimiza os resultados para os procedimentos de reparo de tecidos moles, incluindo correção de hérnia e reconstrução mamária pós-mastectomia.
<b>AlloPatch™</b> (Nova Jérsei, Estados Unidos)	Derivado da pele de aloenxertos humanos, processado para preservar e manter as propriedades naturais do tecido dérmico. Possui as propriedades desejadas à utilização como suporte biológico.
<b>Apligraf™</b> (Massachusetts, Estados Unidos)	Composto de colágeno bovino, queratinócitos e fibroblastos humanos vivos. Estas células são derivadas de prepúcio neonatal humano, que permitem que as proteínas e os fatores de

	crescimento continuam a ser produzidos.
<b>Biobrane</b> <sup>®</sup> (Sugarland, Estados Unidos)	Membrana de colágeno porcino quimicamente ligada a nylon/silicone, usada no tratamento de necrose epidérmica tóxica. Curativo temporário, que diminui a contração de feridas e melhora a troca de fluido.
<b>CollatampFacies</b> <sup>®</sup> (Herisau, Suíça)	Membrana de colágeno bovino tipo I (tendão de Aquiles), associada a um equivalente epidérmico temporário.
<b>Covidien Collagen Repair Patch</b> <sup>™</sup> (Dublin, Irlanda)	Implante biológico acelular composto de colágeno e elastina, derivado da derme porcina. Resistente à degradação por colagenase. É um implante biológico forte e durável, colonizado por células de tecido do hospedeiro e vasos sanguíneos.
<b>Dermagraft</b> <sup>®</sup> (São Petersburgo, Estados Unidos)	Tela dérmica metabolicamente ativa, contém proteínas da MEC, glicosaminoglicanos e fatores de crescimento.
<b>Duoderm</b> <sup>®</sup> (Nova Jérsei, Estados Unidos)	Membrana impermeável com camada profunda de partículas hidroativas agregadas em polímero inerte. Funciona como uma cobertura hidroativa.
<b>Dura-Guard</b> <sup>®</sup> (Saint Paul, Minnesota, Estados Unidos)	Preparado a partir de pericárdio bovino e reticulado. Indicado para reparo dural de crânio e de coluna, ressecção do tumor, trauma, doenças cerebrovasculares, distúrbios congênitos.
<b>Durepair</b> <sup>™</sup> (Califórnia, Estados Unidos)	Composto de colágenos de tecido fetal bovino, é utilizado na reparação durante procedimentos neurocirúrgicos. Pode ser aplicado como enxerto suturável ou implante. É uma armação ao crescimento de fibroblastos e vasos sanguíneos.
<b>EZ Derm</b> <sup>™</sup> (Geórgia, Estados Unidos)	Curativo à base de colágeno porcino reticulado, indicado para queimaduras de espessura parcial, como úlceras de pressão, diabéticas e venosas. Possui capacidade de resposta imunológica e aumenta a quantidade de exsudato.
<b>GraftJacket</b> <sup>™</sup> (Nova Jérsei, Estados Unidos)	Proveniente de pele humana. A pele do enxerto é processada para remover as células epidérmicas e dérmicas, preservando os componentes bioativos e

	a estrutura dérmica. A matriz serve como suporte para repovoamento celular e vascularização.
<b>Graftskin</b> <sup>®</sup> (Nova Jérsei, Estados Unidos)	Tecido equivalente à pele, bilaminado, produzido da pele do prepúcio de recém-nascidos de humanos e de uma matriz de colágeno bovino, purificada e condensada, associada à suspensão de fibroblastos dérmicos.
<b>Integra</b> <sup>™</sup> (Nova Jérsei, Estados Unidos)	Pele artificial, composta por duas camadas. A primeira (externa) é uma membrana de silicone. A camada interna é altamente porosa e composta por glicosaminoglicano e colágeno bovino.
<b>MatriStem</b> <sup>™</sup> (Columbia, Estados Unidos)	Derivado da bexiga urinária porcina. Contém colágeno, carboidratos e proteínas dispostas num arranjo 3D complexo de componentes da MEC. Facilita a remodelação do tecido e contribui à prevenção da formação de tecido cicatricial durante o processo de cura. Material acelular, não reticulado, reabsorvível.
<b>OASIS</b> <sup>®</sup> <b>Matrix</b> (Indiana, Estados Unidos)	Derivado da submucosa intestinal porcina. Indicado ao tratamento de feridas, incluindo as parciais e totais de espessura; úlceras de pressão, venosas, vasculares crônicas e diabéticas; e feridas traumáticas. Não é indicado ao uso em queimaduras de terceiro grau.
<b>OrCel</b> <sup>™</sup> (Nova Jérsei, Estados Unidos)	Matriz de colágeno bovino reticulado. Mantém fibroblastos e queratinócitos alogênicos neonatais em lados opostos, segregadores de fatores de crescimento e citocinas promotoras de cicatrização.
<b>Peri-Guard</b> <sup>®</sup> <b>Repair Patch</b> (Saint Paul, Minnesota, Estados Unidos)	Tecido biológico preparado de pericárdio bovino, reticulado com glutaraldeído. Destina-se ao uso como prótese de reparação cirúrgica de deficiências dos tecidos moles (defeitos da parede torácica e abdominal, gástrica vinculativa e hérnias).
<b>Permacol</b> <sup>™</sup> (Dublin, Irlanda)	Implante de colágeno da derme suína. A matriz de colágeno acelular resultante é reticulada para maior durabilidade.
<b>SurgiMend</b> <sup>™</sup> (Massachusetts, Estados Unidos)	Derivado da derme bovina fetal e neonatal, esta matriz dérmica acelular fornece maior flexibilidade aos cirurgões na escolha da espessura, força e

	tamanho do dispositivo mais apropriado à técnica e ao paciente.
<b>TissueMend™</b> (Massachusetts, Estados Unidos)	Membrana de colágeno acelular usada para aumentar a reparação e reforçar os tecidos moles. Fornece um ambiente biológico para ajudar a curar e fortalecer o tecido até à conclusão do processo cicatricial.
<b>Vascu-Guard®</b> (Massachusetts, Estados Unidos)	Preparado a partir de pericárdio bovino, é indicado ao uso na reconstrução vascular periférica, incluindo vasos sanguíneos tibiais, carótidas e revisões de acesso arteriovenosas.
<b>Veritas®</b> (Massachusetts, Estados Unidos)	Implante de tecido derivado de pericárdio bovino, não reticulado. Material biocompatível, remodelável e que se integra perfeitamente ao tecido circundante.
<b>ZimmerCollagen Patch™</b> (Massachusetts, Estados Unidos)	Implante biológico que consiste em um <i>scaffold</i> acelular de colágeno e elastina, derivado da derme porcina. Material purificado e reticulado, resistente à degradação por colagenase. Não foi observada resposta inflamatória significativa, rejeição, alergenicidade ou sensibilização em testes em animais.

Fonte: adaptada de Kim e Evans (2012) e Moraes (2013).

A maioria dos materiais é de origem humana, bovina ou suína, os quais são os atualmente comercializados. O biomaterial desenvolvido neste trabalho é uma alternativa atuando como uma membrana funcional aplicada na pele. Além disto, possibilita a utilização de novas fontes e diminuir o custo do produto final.

### 3.5.2 Colágeno de fontes alternativas

As atuais principais fontes de colágeno são de pele animal, principalmente de bovinos ou suínos; ou tendões calcâneos, principalmente de bovinos e equinos. Ressalta-se que as propriedades do colágeno, como a resistência mecânica, o volume de absorção de líquidos ou a atividade hemostática diferem dependendo da fonte animal e localização anatômica do material (Ruszczak, 2003; Pei *et al.*, 2013).

De acordo com a diferença da fonte e o processo de extração, diversas formas de colágeno podem ser obtidas, como o colágeno reconstituído, o solúvel e o insolúvel, sendo este o mais utilizado na engenharia tecidual (Ma *et al.*, 2004).

O colágeno bovino é de longe o mais comum. Tem sido amplamente utilizado em muitos dispositivos médicos e produtos de engenharia tecidual. No entanto, este pode induzir uma resposta antigênica e variar de lote para lote (Sachlos; Gotora; Czernuszka, 2006). Além disto, nos últimos anos, o surto de encefalopatia espongiiforme bovina e da crise da febre aftosa causaram restrições ao comércio de colágeno e da necessidade de fontes alternativas seguras do mesmo.

Nagai e Suzuki (2000) investigaram a extração de colágeno de peixes (pele, ossos e barbatanas). Todos os procedimentos foram realizados à baixa temperatura. Para a remoção das proteínas não-colagenosas, as amostras de pele foram imersas em NaOH e, em seguida, a matéria insolúvel foi extraída com ácido acético. Os rendimentos obtidos foram de cerca de 50 %, com base na massa liofilizada.

Ogawa e colaboradores (2004) realizaram a extração de colágeno piscoe à temperatura ambiente. Com relação à caracterização do colágeno extraído, ressalta-se que foi confirmado como um colágeno do tipo I.

O colágeno de peixe-cachimbo foi extraído e parcialmente caracterizado por Khan e colaboradores (2009). A quantidade de colágeno isolado foi de 5,5% para a extração ácida, com base na massa liofilizada. De acordo com a eletroforese padrão, o colágeno pode ser classificado como do tipo I. A temperatura de desnaturação do colágeno foi de cerca de 35 °C. O estudo demonstrou que existe a possibilidade de utilizar o colágeno de peixe-cachimbo como fonte alternativa.

O colágeno a partir de resíduos de pele de enguia marinha (*Evenchelys macrura*) foi isolado e caracterizado para ser testado na liberação de fármacos em condições *in vitro*. Os resultados confirmaram por diferentes técnicas físico-químicas que o material extraído é colágeno do tipo I. Os autores utilizaram o método de Lowry para a quantificação das proteínas totais. A massa molecular média do colágeno extraído foi de ~29-205 kDa e a temperatura de desnaturação foi igual a 38,5 °C, sendo promissor como uma vantagem na aplicação biomédica, devido à proximidade com a do colágeno de mamíferos (Veeruraj *et al.*, 2012).

### 3.5.3 Colágeno de rã-touro

Dentre os vertebrados, os anfíbios são os que possuem a pele mais sensível, devido à exposição a diversos ambientes. Eles são o primeiro grupo de organismos a formar um elo de ligação entre a terra e a água, forçando-os a sobreviver a condições carregadas de predadores e patógenos. Com isto, a pele destes animais é considerada como um tema atraente de pesquisa, por apresentar um alto nível de diversidade bioquímica, com excelente sistema de defesa química (Luo *et al.*, 2008).

As principais fontes de colágeno industriais estão limitadas aos bovinos, suínos e equinos, o que gera uma discussão ativa do seu papel nas doenças transmissíveis, já que o risco de contaminação tem de ser considerado. Assim, uma alternativa segura de colágeno deve ser procurada. No trabalho de Li e colaboradores (2004), a pele de rã-touro foi usada para extrair colágeno. Rã-touro é um anfíbio, que não representa uma ameaça de doenças, podendo ser uma fonte segura e acessível.

A rã, como a maioria dos anfíbios, apresenta grande variedade de substâncias químicas no muco secretado pelas glândulas epidérmicas, as quais vêm sendo estudadas pela indústria farmacêutica em antibióticos e outros medicamentos, constituindo-se num novo campo de estudo da farmacologia. A *Rana catesbeiana* (rã-touro) é uma das espécies ranárias comercialmente importantes no mundo. Com isto, uma quantidade grande dos resíduos de processamento, como a pele, são despejados. A criação de rãs é uma atividade em fase emergente e em franco crescimento no Brasil. A pele constitui 11% da massa viva do animal e quando curtida é empregada como matéria prima na produção de inúmeros objetos, como cintos, pulseiras, vestuário, bijuterias, carteiras, bolsas, sapatos e luvas. Apesar de sua grande importância, existe uma escassez de literatura sobre a histologia da pele da *R. catesbeiana* (Velly, 2001; Ferreira *et al.*, 2006).

Wang; Zhu e Du (2011) extraíram colágeno da trompa de falópio de rã-touro por método enzimático, com rendimento de 16,4%. Foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho e eletroforese em gel de poli(acrilamida), confirmando o tipo I de colágeno.

Lin e Liu (2006) compararam as propriedades físico-químicas do colágeno tipo I extraído de várias espécies diferentes. Foi comprovado que o teor de aminoácidos influencia diretamente na estabilidade térmica. Ressalta-se que na análise de eletroforese, verificou-se a

presença de fragmentos proteicos na amostra de colágeno de rã-touro em maior quantidade, comparado a outros vertebrados.

Sai e Babu (2001) estudaram o colágeno da pele de *R.tigerina*. Este estudo revelou diferenças interessantes no colágeno da pele de rã, comparado ao dos vertebrados conhecidos. Isto pode, provavelmente, ser atribuído à posição dos anfíbios na hierarquia dos vertebrados. Com isto, as investigações detalhadas sobre as propriedades físico-químicas, como a viscosidade e a desnaturação foram realizadas. O estudo confirma que a estabilidade da estrutura colágena é dependente da temperatura do ambiente em que o animal vive, geralmente relacionada com a do corpo do animal. Por exemplo, colágeno do tipo I de bacalhau desnatura a 15 °C, enquanto que o colágeno do tendão da cauda de rato a 38 °C, sugerindo, assim, a relação estreita entre o colágeno e o habitat (Yan *et al.*, 2012).

O estudo de Kumar; Sai e Babu (2002) teve como objetivo compreender o comportamento, a morfologia e a fisiologia de queratinócitos e fibroblastos em substrato de colágeno da pele de rã. O mecanismo de cicatrização de feridas pode ser estabelecido através de culturas *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos, diretamente envolvidos na reparação de feridas. Concluiu-se que o colágeno extraído da pele de rã constitui um bom substrato para a cultura de queratinócitos e fibroblastos, como a maioria dos outros colágenos. Este estudo também contribuiu para que a hipótese de que a eficiência de cura da pele de rã é devida ao colágeno.

A pele de anfíbios se destaca como um xenoinxerto no tratamento de feridas. A razão para o uso da pele da rã está relacionada à sua composição especial, como lipídios, proteínas e peptídeos e também pelos componentes bioativos de secreções da pele. O objetivo do estudo de Rezazade Bazaz *et al.* (2013) foi avaliar os efeitos da aplicação tópica da pele de rã liofilizada em pó (*R. ridibunda*) na cicatrização de feridas em ratos. Os resultados indicaram influências farmacêuticas da pomada de pele de rã liofilizada na cicatrização; inclusive, efeitos positivos sobre a redução da inflamação, aumento na proliferação de fibroblastos, aumento na quantidade de colágeno de MEC e neovascularização e fechamento mais rápido da ferida. O tratamento com a pele da rã desempenhou um papel eficaz na redução da carga microbiana no local da ferida, confirmando as propriedades antibacterianas. Em conclusão, com base nos resultados, a pomada de pele de rã liofilizada afetou benéficamente o ambiente da ferida e claramente acelerou o processo de

cura. Considerando as propriedades da pele de rã, o fácil acesso, o baixo custo de preparação e de preservação barata, esta se mostra um material útil e eficiente à cicatrização.

### 3.6 ESTADO DA ARTE E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Inspirado pela estrutura hierárquica, biocompatibilidade, atoxicidade e propriedades mecânicas de dois biopolímeros bem conhecidos, colágeno e nanocelulose, são feitas tentativas para desenvolver biomateriais com elevada resistência mecânica e boa biocompatibilidade. Estas propriedades pretendidas devem ser similares aos tecidos cutâneos. As fibras celulósicas são amplamente utilizadas como reforços baseados em várias matrizes poliméricas devido às suas propriedades mecânicas superiores. Os materiais à base de celulose induzem respostas inflamatórias, sendo considerados como biocompatíveis.

No estudo de Mathew e colaboradores(2012), *scaffolds* implantáveis com base de colágeno reforçados com celulose foram desenvolvidos aproveitando o potencial da celulose em proporcionar reforço mecânico e estabilidade dimensional ao material sem afetar a biocompatibilidade e a atoxicidade do colágeno. Os estudos de biocompatibilidade não indicaram citotoxicidade para as estruturas de colágeno e celulose, concluindo que estas superfícies compostas são favoráveis à adesão e ao crescimento celular, tornando-se um material promissor às aplicações biomédicas.

A NC tem sido estudada para o uso como *scaffold* para engenharia tecidual e curativos. Ainda assim, curativos inovadores tem sido continuamente desenvolvidos numa vasta gama de materiais, como alginato, poliuretano, quitosana, e *Aloe vera*. Com base nas propriedades vantajosas da NC e do gel de *Aloe*, um filme composto foi desenvolvido pela suplementação do gel durante a biossíntese de celulose pela primeira vez por Saibuatong e Phisalaphong (2010). A morfologia superficial, a estrutura dos poros, a resistência à tração, a capacidade de absorção de água, a cristalinidade e a permeabilidade ao vapor de água dos filmes modificados foram analisados e comparados com os filmes de NC, concluindo que este tipo de combinação destes materiais foi preparado com resultados satisfatórios à aplicação desejada.

Estudos de citotoxicidade foram conduzidos com células humanas, utilizando filmes de celulose comerciais, principalmente para

efeito de cura de feridas. O estudo de Almeida e colaboradores (2014) é o primeiro relatório de avaliação de irritação da pele humana de membranas de NC sob oclusão. O teste de sensibilidade após aplicação única é um procedimento amplamente utilizado para avaliar reações irritantes agudas. Neste método, a oclusão é conseguida por meio de uma câmara de alumínio, a fim de exagerar as condições de exposição. Várias técnicas de bioengenharia têm sido desenvolvidas para fornecer dados quantitativos e avaliar as reações irritantes com uma abordagem combinada, a fim de cobrir as diferentes características de irritação da pele. Foi avaliado o potencial irritante de membranas de NC na pele (com e sem glicerina) e o seu efeito de hidratação cutânea.

O estudo de Wiegand *et al.* (2006) testou a influência da NC sobre os parâmetros típicos de feridas crônicas, utilizando NC e colágeno bovino *in situ*. O biopolímero foi capaz de estabelecer uma fisiologia normal da ferida em tempo reduzido. Concluiu-se que o tratamento clínico com materiais de reparação baseados em NC pode ser considerado como um método eficiente ao tratamento de feridas agudas e crônicas.

Luo e colaboradores (2008) relataram a preparação de membranas de colágeno e NC pela adição de colágeno ao meio de cultura de *Acetobacter xylinum*. Os resultados obtidos por MEV demonstraram que este composto tem micromorfologia diferente, sendo que suas nanofibrilas são mais porosas que a de NC pura, significando um composto com maior área de superfície. Por conseguinte, tem o potencial de utilização como suporte para engenharia tecidual e, devido à grande área de superfície, é benéfico à adesão celular e à vascularização.

O biopolímero de nanocelulose/colágeno (tendão porcino) desenvolvido por Zhijiang e Guang (2011) foi preparado por imersão das membranas de NC úmidas em solução colágena, seguido pelo processo de liofilização.

No estudo de Lin e colaboradores (2013), as membranas de NC foram incorporadas com solução de quitosana. Foram avaliadas as propriedades mecânicas, de retenção de água, transmissão de vapor de água e atividade antibacteriana e citocompatibilidade. O biomaterial foi desenvolvido a fim de acelerar o processo de cicatrização e diminuir a taxa de infecção.

Steele e colaboradores (2013) produziram filmes de celulose e colágeno bovino a fim de melhorar as propriedades mecânicas, visando

aplicação como uma matriz antiadesiva ou na engenharia tecidual cardiovascular. Foi constatado que as células de músculo liso de artérias coronárias humanas aderiram e proliferaram sobre os filmes.

Moraes (2013) desenvolveu membranas e hidrogéis à base de NC e colágeno bovino. Foram realizadas as análises de características do biomaterial e a experimentação animal, as quais concluíram que os materiais são biocompatíveis e possíveis de aplicação à medicina regenerativa.

Souza e colaboradores (2013) produziram membranas de colágeno bovino incorporadas de própolis vermelho que favorecem a contração da ferida e reduzem a magnitude da resposta inflamatória. Os testes foram realizados *in vivo*, concluindo uma melhor organização da deposição colágena e promoção da formação de tecido granular e anexos cutâneos.

O propósito do trabalho de Albu e colaboradores (2014) foi preparar biomateriais baseados em NC e colágeno, a fim de investigar os efeitos da junção destes materiais nas propriedades (térmica, mecânica e morfológica) do material obtido, visando aplicação no campo biomédico. Constatou-se que a estabilidade térmica e a propriedade mecânica foi melhorada com a adição de colágeno.

Mathew e colaboradores (2012) desenvolveram um biomaterial de NC e colágeno extraído de cavalos na forma de filme. Foram realizados testes de citocompatibilidade utilizando células osteogênicas com resultados favoráveis à adesão e ao crescimento celular.

Amsaveni e colaboradores (2013) descreveu a síntese de novas fibras biodegradáveis híbridas utilizando a mistura ternária de colágeno, celulose, e albumina de soro bovino. O colágeno utilizado no estudo era proveniente de resíduos de pele de animais da indústria do couro. As fibras formadas foram caracterizadas quanto às propriedades físicas, estruturais, morfológicas, térmicas e biológicas e foi concluído, por meio dos resultados obtidos, que o material pode ser empregado como material bioabsorvível de sutura.

Li e colaboradores (2014) produziram um biopolímero de NC e ácido hialurônico com propriedades adequadas à aplicação na reparação de pele e cicatrização. A incorporação de substâncias que permitam a adsorção de proteínas e a aderência celular é imprescindível ao processo cicatricial. Baseado nos resultados obtidos, observou-se que os filmes produzidos apresentam propriedades de materiais curativos.

A necessidade de buscar estratégias para acelerar o processo cicatricial tem tornado crescente os estudos em torno da utilização de materiais que propiciem os mecanismos de proliferação celular e melhores condições para a recuperação cutânea; e, neste âmbito, a engenharia tecidual tem feito enormes progressos, com a utilização de materiais produzidos a partir de biomateriais. Estes produtos abrangem um grupo heterogêneo destinados a substituir, de forma temporária ou permanentemente, a forma e a função dos tecidos perdidos. As membranas biopoliméricas vêm suprindo a crescente demanda de materiais com caráter renovável, biodegradável e sustentável, sendo cada vez mais importantes para esse segmento, satisfazendo também as exigências de um curativo ideal (Souza, 2013).

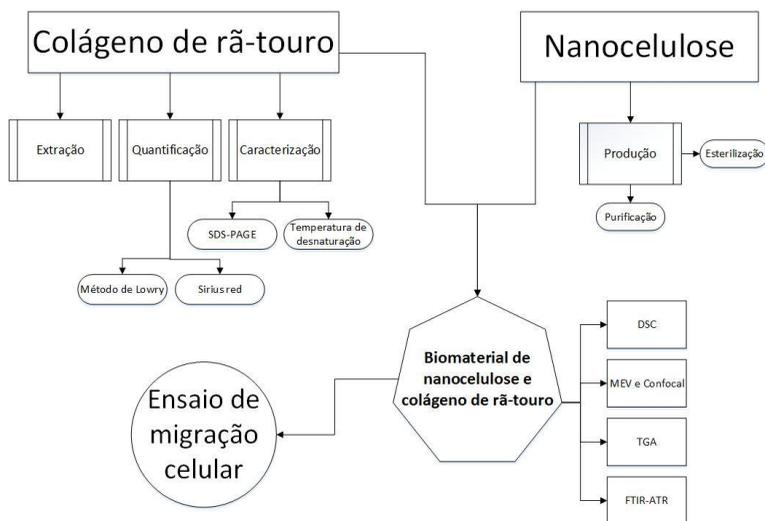
Existem poucos trabalhos científicos que utilizam biomateriais de colágeno e nanocelulose e a maioria destes utilizam colágeno bovino ou suíno, mais comumente comercializado. A importância do trabalho está na confirmação de que o uso de fontes alternativas é viável tanto no desenvolvimento da membrana quanto na aplicação visando à cicatrização de feridas. Além disto, objetiva-se a utilização comercial do colágeno de rã-touro tanto quanto a dos já existentes.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em sua totalidade no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA), com colaboração do Laboratório de Materiais da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), Laboratório de Polímeros da Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC) e do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

O trabalho experimental foi desenvolvido de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 5. Este se baseia partindo da nanocelulose e do colágeno de rã e do biomaterial formado pelos dois materiais.

Figura 5 – Fluxograma geral das metodologias realizadas neste trabalho.



### 4.1 ORIGEM DO COLÁGENO

As amostras de pele de rã-touro (*R. catesbeiana*) (Figura 6) foram cedidas pela empresa VellyFARM, sob responsabilidade da empresária Maria de Lourdes Mourinho Velly. Como material de comparação, as amostras de colágeno hidrolisado tipo I extraído de pele bovina foram

cedidas pelo Professor César Benfatti, do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Figura 6 –Amostra de pele de rã-touro (*Rana catesbeiana*).



## 4.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DE RÃ-TOURO

### 4.2.1 Extração do colágeno de rã-touro

Para a extração do colágeno, seguiu-se protocolo descrito por Zhang *et al.* (2014). A pele da rã-touro (3 g) foi tratada com NaOH 0,1 M (1:100 m/v) sob agitação contínua por 24 h, à temperatura ambiente, para remoção das impurezas presente na pele. A pele foi lavada repetidamente com água destilada até atingir pH neutro. Em seguida, esta foi embebida em ácido acético 0,5 M (1:100 m/v) por 72 h sob agitação contínua a 4 °C. O extrato foi centrifugado a  $4800 \times g$  por 1 h. Adicionou-se NaCl a uma concentração final de 2,5 M, na presença de Tris-HCl 0,05 M, a pH 7,0. O precipitado resultante foi recolhido por centrifugação (Beckman Coulter Optima L - 90k Ultracentrifuge, EUA) a  $10000 \times g$  por 1 h. O *pellet* foi dissolvido em ácido acético 0,5 M, dialisado (*Biotech Grade Dialysis Membranes*, Spectrum Labs, Texas, EUA) contra ácido acético 0,1 M por 24 h e contra água destilada por 48 h, seguido por liofilização.

### 4.2.2 Quantificação de proteínas totais pelo Método de Lowry

Determinou-se a quantidade de proteínas totais extraídas da pele de rã-touro pelo método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951), que consiste em duas reações colorimétricas: a reação de Biureto, na qual os íons  $\text{Cu}^{2+}$  interagem com as ligações peptídicas originando uma coloração azul intensa; e a reação que envolve a adição do reagente de

Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EUA) em uma mistura complexa de sais inorgânicos, cuja reação com a tirosina e o triptofano resulta em uma coloração azul esverdeada intensa. A combinação dessas duas reações fornece um teste muito mais sensível que as duas reações isoladamente. Nesta etapa, foram combinados 20 µL do sobrenadante, 60 µL de água MiliQ e 200 µL do Reagente A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%; NaOH 0,1 M; CuSO<sub>4</sub> 1%; Tartarato 2%). O teste foi realizado à temperatura ambiente. Após o tempo de reação de 10 minutos, adicionou-se 20 µL do Reagente B (Folin) e aguardaram-se 20 minutos para a análise em espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus 384, EUA), a 750 nm. O padrão utilizado para a determinação foi albumina de soro bovino, no intervalo de 0-60 mg de proteína e os dados foram expressos como µg de proteína·mL<sup>-1</sup>. A curva padrão obtida está apresentada no Apêndice A (Saska *et al.*, 2012).

#### 4.2.3 Quantificação de colágeno de rã-touro por *Sirius red*

A fim de quantificar o colágeno extraído da pele de rã-touro, utilizou-se o método de coloração *Sirius red*. As amostras foram coradas com *Sirius red*, que consiste em 0,1 % de *Direct red* F3B (Sigma-Aldrich, EUA) em uma solução aquosa saturada de ácido pícrico, homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 minutos para que ocorresse a precipitação do colágeno presente na amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm (25 °C) (Beckman Coulter Optima L - 90k Ultracentrifuge, EUA). O sobrenadante foi retirado, o *pellet* foi lavado com água acidificada suave e adicionou-se 1 mL de KOH para reagir por 15 minutos. A concentração de colágeno foi obtida graficamente contra a absorbância correspondente resultando numa curva padrão, utilizando o *software* do espectrofotômetro UV-VIS (Molecular Devices, Spectra Max Plus 384, EUA), em 550 nm. Foi utilizado colágeno bovino para a construção da curva padrão nos intervalos de 0 a 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>, descrita no Apêndice B (Suganya *et al.*, 2014).

#### 4.2.4 Caracterização do colágeno de rã-touro por SDS-PAGE

Para avaliar o perfil proteico do colágeno extraído, caracterizado pela determinação do tipo de colágeno e a sua massa molar, fez-se a eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio

(SDS-PAGE), com base no método de (Laemmli, 1970), utilizando-se um gel de separação de poliacrilamida 8% (Bis Acrilamida 30%, Tris HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, persulfato de amônia 10%, TEMED, água bidestilada) e gel de concentração de 4% (Bis Acrilamida 30%, Tris HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 10%; persulfato de amônia 10%; TEMED; água bidestilada). O colágeno extraído liofilizado foi dissolvido em ácido acético 0,5 M e essa solução ( $30 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) foi misturada ao tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8; SDS a 10%; azul de bromofenol 1%; glicerol; 2-mercaptoetanol e água destilada) numa proporção 1:1. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 96 °C. Cerca de 20  $\mu\text{L}$  de amostra foi carregada no gel. A corrente elétrica aplicada foi de 30 mA e a voltagem foi de 100 V, por aproximadamente 4 h. A massa molar do marcador padrão (M) empregado foi de 10–250 kDa (Precision Plus Protein Dual Color Standards BenchMark™ ProteinLadder - Life Technologies). Após a corrida, o gel foi fixado em uma solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 10%) por 4 h e, em seguida, corado por Coomassie brilliant blue-R (CBB R-250) até que as bandas fossem significativamente observáveis (Aro, 2012).

#### 4.2.5 Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno de rã-touro

A temperatura de desnaturação ( $T_D$ ) foi determinada pelo método citado por Qian e colaboradores (2007). Foi utilizado 540  $\mu\text{L}$  de solução de colágeno ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em ácido acético 0,1 M para a medição da viscosidade. As taxas de fluxo usadas como um índice para cálculo de viscosidades reduzidas foi a média de três observações. A  $T_D$  do colágeno em solução foi determinada pelas mudanças na viscosidade induzidas pela temperatura usando um viscosímetro HAAKE™ RheoWin™ (ThermoScientific, EUA). A viscosidade relativa foi calculada segundo a Equação 1.

$$\text{Viscosidade relativa} = \left( \frac{\text{viscosidade}_{\text{medida}} - \text{viscosidade}_{\text{mín}}}{\text{viscosidade}_{\text{máx}} - \text{viscosidade}_{\text{mín}}} \right) \quad (1)$$

A temperatura de desnaturação foi considerada como a temperatura em que a viscosidade relativa foi de 0,5 (Wu *et al.*, 2014).

### 4.3 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE E COLÁGENO DE RÃ-TOURO

#### 4.3.1 Produção das membranas de nanocelulose

Para a produção das membranas de NC, o meio de cultura foi preparado contendo  $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de manitol,  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de peptona, todos diluídos em 1 L de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 6,5 e, em seguida, esta foi autoclavada por 20 min a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  (Recouvreux, 2008). As membranas de NC foram preparadas com a adição de 90% (v/v) do meio de cultura descrito anteriormente e 10% (v/v) de solução estoque de inóculo contendo a bactéria *Komagataeibacter hansenii* (*Gluconacetobacter hansenii* — ATCC 23769). Na síntese das membranas, as culturas foram mantidas em placas de cultura de 24 poços (TPP, Suíça). Em cada poço, foi adicionado 1 mL da formulação. A formação das membranas ocorreu na interface ar/líquido durante 10 dias de cultura mantida a temperatura ambiente e sob condições estáticas de cultivo. Passados os 10 dias, as membranas de NC foram retiradas das placas de cultura e, sucessivamente, purificadas e esterilizadas. Esta etapa consiste na remoção de células bacterianas e impurezas. Dessa forma, colocaram-se as membranas em frascos contendo NaOH 0,1 M, por 24 h a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após este período, a solução alcalina foi retirada e as membranas foram lavadas com água destilada até atingir pH neutro. Em seguida, as membranas foram autoclavadas e estocadas à temperatura ambiente.

#### 4.3.2 Incorporação de colágeno nas membranas de nanocelulose

Adaptando a metodologia de Zhijiang e Guang (2011) e Xue colaboradores (2012), as membranas de NC foram imersas em solução de ácido acético 0,5 M por 24 h. Em seguida, foram colocadas em soluções de colágeno de rã-touro/ácido acético 0,5 M com as concentrações de 38,5; 95,5 e  $273,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h. Depois disto, o excesso da solução colágena foi removido usando papel-filtro. As quantidades inicial e final de colágeno foram verificadas utilizando a metodologia descrita anteriormente no item 4.2.3. A quantidade de colágeno incorporado por massa de NC foi calculada pela Equação 2.

$$\frac{\mu\text{mol de COL incorporado}}{\text{g de BNC}} = \frac{\text{COL I} - \text{de COL F}}{\text{g de BNC}} \quad (2)$$

Onde:

COL I é a concentração inicial de colágeno em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

COL F é a concentração final de colágeno em  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 4.3.3 Caracterização das membranas de nanocelulose e colágeno de rã-touro

#### 4.3.3.1 Avaliação da morfologia dos biomateriais

A morfologia das amostras foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente congeladas ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 24 h e liofilizadas (48 h), com a utilização do liofilizador modelo L101 (LIOBRAS, Brasil). Após secagem, as amostras foram devidamente armazenadas em dessecador. A preparação das amostras e as análises por microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. As amostras liofilizadas foram fixadas sobre fitas de carbono aderidas a suportes de alumínio (*stubs*) e, posteriormente, metalizadas com ouro. A microestrutura foi analisada no equipamento JEOL JSM-6390LV a uma tensão de 10 kV.

As amostras para a análise em microscopia eletrônica confocal (Leica DMI6000) foram imersas em solução de *Calcofluor White* 0,1 % (m/v) (Sigma-Aldrich, EUA) por 1 h, a fim de corar as fibras de NC (Phan *et al.*, 2015). Retirado o excesso, estas foram imersas em solução de *Sirius red* por 1 h, corante das fibras colágenas (Keira *et al.*, 2004). Em seguida, foram lavadas com água acidificada suave, a fim de eliminar o excesso de corante nas membranas. Os comprimentos de onda, nos quais ocorrem a excitação e a emissão do *Calcofluor White* e *Sirius red* são 405/455 e 550/650, respectivamente. A análise foi realizada no LCME da UFSC.

#### 4.3.3.2 Temperatura de transição vítrea e de fusão dos biomateriais

A medição da transferência de calor para a amostra por meio das curvas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram obtidas em um DSC-Q20/TA Instruments (Laboratório de Materiais/UNIVILLE). Aproximadamente 10 mg de amostra foram

aquecidas a  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , de 25 a  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As análises foram realizadas sob fluxo de  $\text{N}_2$  ( $50\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ).

#### **4.3.3.3 Estabilidade térmica dos biomateriais**

As mudanças dependentes do tempo e da temperatura na massa das amostras observadas pelas curvas da termogravimetria (TG) foram obtidas em uma termobalança TGA-Q50/TA Instruments (Laboratório de Materiais/UNIVILLE). Cerca de 4,0 mg de amostra foram aquecidas de 25 até  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  sob atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ .

#### **4.3.3.4 Caracterização dos grupamentos funcionais dos biomateriais**

A medição do comprimento de onda e a intensidade da absorção de luz infravermelha das amostras foram realizadas em um equipamento da Perkin-Elmer Spectrum One B (Laboratório de Caracterização de Materiais/UDESC) de  $4000$  a  $450\text{ cm}^{-1}$ , resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e acessório de refletância total atenuada (ATR).

### **4.4 EFEITO DO COLÁGENO NA MIGRAÇÃO E INVASÃO DE QUERATINÓCITOS**

#### **4.4.1 Linhagem celular**

A linhagem celular utilizada para o estudo foi queratinócito (HaCaT), cultivado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina e 0,3% de bicarbonato de cálcio (Sigma-Aldrich, EUA); e mantido em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ , a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após confluência celular de 80 a 90%, as células foram removidas com o uso de tripsina (Gibco® trypsin, Life Technologies, EUA) e a suspensão de células foi quantificada utilizando-se uma câmara de Neubauer (SP LABOR, Brasil). Após a contagem, as células foram distribuídas conforme cada ensaio.

#### 4.4.2 Ensaio de migração celular

O ensaio de migração celular foi realizado para estimar as taxas de migração e proliferação das células quando expostas ao biopolímero de NC e colágeno e às diferentes concentrações de colágeno de rã-touro e bovino. Para o ensaio de migração, utilizando o método de *Wound assay*, as células HaCaT foram plaqueadas em placas de 6 poços ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) e mantidas em estufa até a confluência de 100%. Com o auxílio de uma ponteira de micropipeta, fez-se um risco na placa e a mesma foi então lavada três vezes com PBS para a remoção das células que se soltaram. Posteriormente, as células foram incubadas com meio novo completo contendo os controles (NC e solução de ácido acético 0,001 M), as membranas de NC/COLR, as concentrações de COLR (38,5; 95,5 e 273,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e de COLB (1, 5 e 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As fotos dos riscos foram obtidas nos tempos de 0, 24 e 48 h para a análise da migração celular. A área do fechamento do risco foi calculada com o auxílio do software *Image Processing and Analysis in Java (ImageJ)* (National Institute of Mental Health, EUA) nos diferentes tempos e sua porcentagem foi calculada com a Equação 3 (Yue *et al.*, 2010; Cory, 2011):

$$\% \text{ de fechamento da ferida} = \frac{A_{t0} - A_{t=\Delta t}}{A_{t0}} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software Origin 8.5 (*OriginLab Data Analysis and Graphing Software. OriginLab Corporation – Northampton – MA 01060, EUA*). Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e comparados pela análise de variância univariada (*one-way ANOVA*) seguida do teste Tukey para verificar a existência de diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

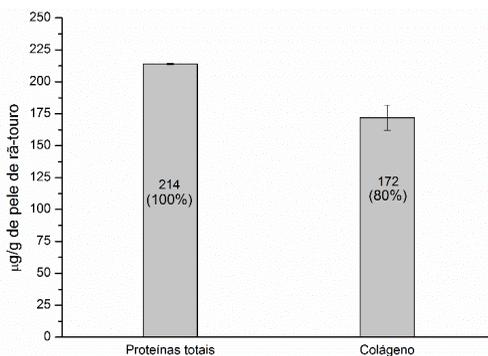
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO DE RÃ-TOURO

A análise quantitativa de extração de proteínas totais e de colágeno da pele de rã-touro foi realizada utilizando o método de Lowry e por *Sirius red*, respectivamente. A Figura 7 apresenta a massa de proteínas totais e de colágeno extraído por massa de pele de rã-touro, segundo método de extração ácida estabelecido por Zhang e colaboradores (2014).

Observa-se que a quantidade de colágeno extraída corresponde a  $172 \mu\text{g} \cdot (\text{g de pele de rã-touro})^{-1}$ , equivalente a 80% das proteínas totais quantificadas. Lin e Liu (2006) demonstraram que o colágeno de rã-touro apresenta maiores quantidades de fragmentos de proteínas comparado aos de outras espécies, provavelmente o que corresponde aos outros 20% (fração não colagênica).

Figura 7 – Proteínas totais e massa de colágeno extraída da pele de rã-touro por meio de extração ácida. Resultados expressos em  $\mu\text{g/g}$  de pele de rã-touro (média  $\pm$  desvio padrão, n=6).



Não há registros na literatura sobre a quantidade exata de colágeno na pele de rã-touro, como em outros animais, como os peixes, que já estão bem definidos. A extração de colágeno de fontes alternativas aos bovinos e porcinos é realizada há muitos anos e para diversas espécies de animais, que vão desde os peixes até os anfíbios e

mamíferos (Lin e Liu, 2006). A extração do colágeno de rã-touro vem como uma alternativa inovadora, acessível e segura ao colágeno bovino.

Alguns aspectos importantes devem ser levados em consideração para a extração do colágeno da pele de rã-touro. Como esperado, quanto menor a área de superfície da amostra, melhores resultados de extração são obtidos, uma vez que a agitação também influencia no contato com a solução ácida. Com isso, optou-se por cortar as peles em pedaços bem pequenos, com área aproximada de 1 cm<sup>2</sup>. A imersão inicial em solução de NaOH é imprescindível para diminuir o teor de impurezas e matérias insolúveis da amostra antes da extração propriamente dita pela solução ácida. A quantidade de amostra a ser utilizada pode ser variada, uma vez que o método foi estabelecido. Todavia, a concentração de solução ácida deve ser preservada. Segundo Aukkanit e Garnjanagoonchorn (2010) e Pati; Adhikari e Dhara (2010) afirmam, a temperatura baixa na primeira etapa da extração também é primordial à preservação da integridade estrutural do colágeno a ser extraído. O pH deve ser ajustado na faixa de 1-4, uma vez que o colágeno apresenta alta solubilidade comparado ao pH neutro. Além disso, nesta condição, o colágeno está abaixo do seu ponto isoelétrico (a pH neutro), no qual é mais acentuado o processo de fibrilogênese, em que as moléculas se organizam em forma de fibras e dificultaria a posterior interação com a NC (Tonhi e Plepis, 2002; Veeruraj; Arumugam; Balasubramanian, 2013).

Conforme Campos (2008), o processo de precipitação salina provoca a interação das fibrilas de colágeno com os íons sódio e cloro em solução. À medida que se adiciona esta solução, ocorre a agregação das fibrilas, que é provocada por ligações químicas catalisadas por estes íons. A superfície das fibrilas colágenas interagem com os íons, já que possui cargas positivas e negativas, oriundas dos resíduos de aminoácidos formadores das próprias cadeias polipeptídicas. A diminuição da solubilidade do colágeno pode ser descrita como sendo devida ao efeito da alta concentração de cloreto de sódio, uma vez que o aumento na força iônica causa uma redução na solubilidade das proteínas pelas interações hidrofóbicas entre as cadeias proteicas, e aumenta a competição dos sais iônicos pela água, permitindo a precipitação colágena mais facilitada (Singh *et al.*, 2011).

O último passo do processo de extração de colágeno, e um dos mais importantes, é a diálise. Montanha (2012) cita que este é um processo de separação por difusão de moléculas por meio de poros de uma membrana semipermeável. Esta transferência molecular ocorre por

diferença de concentração entre as soluções em contato com a membrana, a fim de igualar os potenciais químicos, ou as concentrações, resultando em uma solução de colágeno mais pura, retirando o máximo de cloreto de sódio.

Os resultados finais de massa seca em porcentagem obtidos pela precipitação foram de  $8,47 \pm 0,5$  %. Estes resultados corroboram com os encontrados por Qian e colaboradores (2007), que encontraram 7% para a mesma espécie anfíbia. A diferença encontrada nesta metodologia está na precipitação, que neste caso ocorrem três vezes. Diferentemente dos resultados obtidos por este, o colágeno extraído solubilizou facilmente em ácido acético, provavelmente devido à diálise realizada com total substituição do solvente anterior.

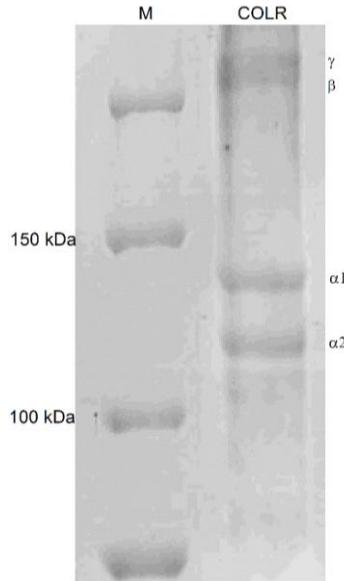
A maioria das publicações científicas relacionadas à extração de colágeno de fontes alternativas aos bovinos e porcos se baseia na metodologia de Nagai e Suzuki (2000). Estes autores utilizaram várias espécies píceas e obtiveram resultados de extração em porcentagem variados.

O diferencial deste trabalho comparado à literatura está na quantificação de proteínas totais e colágeno após a extração, haja vista que os outros autores apenas obtêm os resultados por meio da massa seca resultante ao fim do processo. Estes resultados podem não ser confiáveis sem os testes que comprovem a quantidade proteica nesta massa seca obtida, uma vez que o processo de extração envolve algumas etapas que influenciam diretamente na massa final, como a adição de sal e a diálise.

### **5.1.1 Caracterização do colágeno de rã-touro por SDS-PAGE**

Uma técnica de caracterização utilizada para comprovar o tipo de colágeno extraído é o método da eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Esta técnica separa de maneira eficaz os extratos proteicos, permitindo deste modo estimar a massa molar. A Figura 8 apresenta o perfil densiométrico obtido a partir do gel de colágeno de rã-touro, no qual as bandas correspondentes  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  numa razão de 1,2 típica de colágeno tipo I. As massas molares calculadas a partir do marcador de proteínas padrão foram 135 kDa ( $\alpha 1$ ) e 117 kDa ( $\alpha 2$ ), valores estes que estão de acordo com os descritos na literatura (Tonhi e Plepis, 2002).

Figura 8 – Eletroforese em Gel de SDS-PAGE de colágeno de rã-touro (COLR) extraído. O marcador de proteínas (M) está na coluna à esquerda.

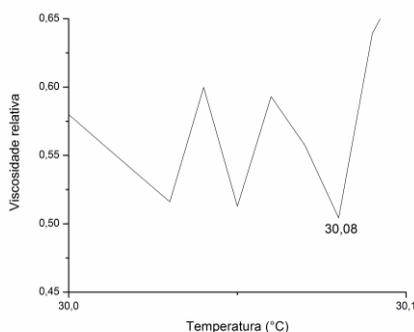


Wang; Zhu e Du (2011) realizaram a análise de SDS-PAGE, concluindo que o colágeno extraído do tubo de falópio de *Rana catesbeiana* consistiu de cadeias  $\alpha$  ( $\alpha 1$  cerca de 138 kDa e cadeia  $\alpha 2$  cerca de 115 kDa), que mostrou duas espécies distintas e o seu dímero (cadeia  $\beta$ ), com a presença também de componentes  $\gamma$ . As bandas difusas abaixo das cadeias  $\alpha 2$  e  $\beta$  provavelmente estão associadas às impurezas presentes na quantificação proteica total (20%) anterior. A presença de cadeias beta e gama indicam que a amostra de colágeno apresenta reticulação. A intensidade das mesmas está relacionada à exposição à luz ultravioleta, método de esterilização utilizado neste trabalho. A radiação UV atinge as proteínas de um modo diferente devido às diferentes composições dos aminoácidos e estrutura molecular.

### 5.1.2 Determinação da temperatura de desnaturação do colágeno de rã-touro

A  $T_D$  do colágeno de rã-touro extraído foi calculada utilizando uma curva de variação induzida pela temperatura na viscosidade (Figura 9). A  $T_D$  do colágeno de rã-touro foi encontrada a 30,08 °C quando a viscosidade relativa foi igual a 0,5.

Figura 9 – Temperatura de desnaturação do colágeno de rã-touro.



Pelo mesmo método de determinação de  $T_D$ , pode-se observar na Tabela 2 alguns resultados de temperatura de desnaturação similares a este trabalho. Sai e Babu (2001) realizaram a análise na pele de *R. tigerina* a uma concentração de ácido acético dez vezes menor e encontraram o valor de 36 °C na viscosidade relativa determinada.

Tabela 2 – Temperatura de desnaturação ( $T_D$ ) de colágeno de rã-touro.

Temperatura de desnaturação (°C)	Referências
29,6	Wang; Zhu e Du (2011)
29,8	Li (2004)
33,8	Qian <i>et al.</i> (2007)

A temperatura de desnaturação de peixes e anfíbios é menor que a dos bovinos (42 °C) e suínos (37 °C). Isto pode ser atribuído à natureza bioquímica e fisiológica, ou seja, à correlação da  $T_D$  com a temperatura do corpo dos organismos e o ambiente em que residem (Wu *et al.*, 2014).

Além disto, Li e colaboradores (2008) relataram que o colágeno de animais terrestres tem uma temperatura de desnaturação mais elevada do que as de anfíbios e peixes, devido ao seu elevado teor de aminoácidos. O aumento da temperatura de desnaturação também está ligado ao grau de reticulação da amostra.

Considera-se que a aplicação posterior da membrana de NC e colágeno de rã-touro como curativo não interfere nos resultados esperados, mesmo que a temperatura do corpo humano seja de aproximadamente 37 °C e a desnaturação da amostra de colágeno de rã-touro seja inferior.

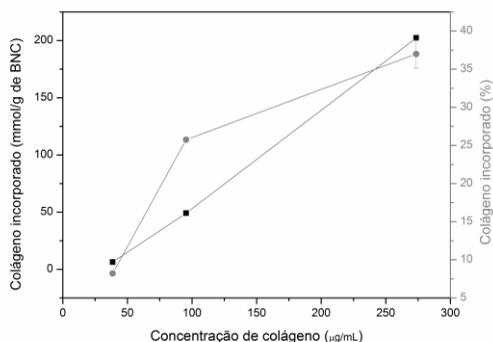
## 5.2 PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE NANOCELULOSE E COLÁGENO DE RÃ-TOURO

### 5.2.1 Incorporação de colágeno nas membranas de nanocelulose

Existem duas maneiras conhecidas de desenvolver uma estrutura de NC e colágeno, uma que trata da incorporação de colágeno no meio de cultura durante o processo de produção da NC e a outra que diz respeito à imersão da membrana de NC em solução de colágeno, seguido de liofilização. Todavia, o primeiro processo não é viável se o objetivo for manter a estrutura colágena, uma vez que o processo de esterilização da NC é por meio de autoclavagem a 121 °C, o que desnaturaria a proteína e a transformaria em gelatina. Além disto, a purificação das membranas é realizada com sucessivas lavagens em NaOH e o pH alto também compromete a estrutura proteica. Então, a incorporação de colágeno após a purificação e a esterilização das membranas de celulose é a metodologia mais apropriada para manter a integridade das moléculas colágenas (Saska *et al.*, 2012).

Foi possível obter a quantidade inicial e final de colágeno incorporado, bem como o percentual de incorporação de colágeno nas membranas de nanocelulose. Estes resultados são expressos na Figura 10.

Figura 10—Incorporação de colágeno de rã-touro por massa de nanocelulose (NC). ● representa a porcentagem de incorporação de colágeno nas membranas de NC e ■ representa a quantidade de colágeno incorporado por massa de NC.



Considerando a mesma massa de membrana de NC, a incorporação de colágeno aumenta com a concentração utilizada. Esta proporcionalidade é esperada até que a NC atinja sua saturação de conteúdo incorporado, o que não ocorreu nas concentrações utilizadas neste experimento. Para uma concentração colágena de  $273,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , observa-se uma porcentagem de incorporação de 37 %, considerada como o melhor resultado de incorporação neste trabalho.

O propósito deste trabalho é unir as características de suporte, biocompatibilidade e hidrofiliabilidade da nanocelulose com as propriedades de estímulo à resposta celular do colágeno, ao passo que esta membrana biopolimérica aja na aceleração do processo de cicatrização.

Considerando a aplicação posterior em contato com as células da pele, visando à cicatrização, ressalta-se a necessidade de uma baixa quantidade de colágeno incorporado nas coberturas de feridas. Isto se deve pelo fato de que os fibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno, reconhecem a presença do componente da MEC e se multiplicam mais rapidamente do que na ausência de colágeno.

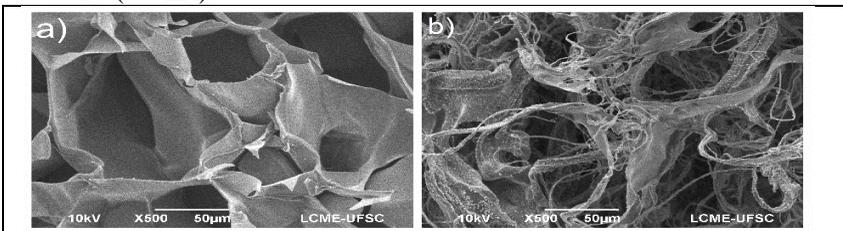
## 5.2.2 Caracterização das membranas de nanocelulose e colágeno de rã-touro

A nomenclatura das membranas foi simplificada, de forma que estas foram denominadas como: COLB para o colágeno bovino e COLR para o colágeno de rã-touro; NC/COLB para a membrana de NC e colágeno bovino; e NC/COLR para a de NC e colágeno de rã-touro.

### 5.2.2.1 Análise da morfologia dos biomateriais – MEV e confocal

O MEV pode ser utilizado para fornecer informações sobre a morfologia dos biomateriais puros e o comportamento dos mesmos quando combinados. Da análise morfológica, são obtidas imagens bidimensionais que permitem relacionar e comparar o arranjo das nanofibrilas das membranas biopoliméricas, a forma com que ocorreu a incorporação do colágeno na nanocelulose e as diferenças micrográficas entre os colágenos de rã-touro e bovino. Esta é uma técnica eficiente e amplamente utilizada para capturar a estrutura de rede na característica de hidrogéis (Moraes, 2013). As imagens obtidas por MEV são apresentadas nas Figura 11 e Figura 12.

Figura 11– Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de (a) colágeno bovino (COLB) e (b) colágeno de rã-touro (COLR).



A análise morfológica do colágeno bovino (Figura 11a) foi similar à encontrada por Li e colaboradores (2013) e Ma e colaboradores (2003), a qual mostrou poros alveolados uniformes e regulares. Isto não ocorreu para a amostra do colágeno de rã-touro (Figura 11b), que apresentou uma morfologia irregular, com a presença de fibras e interface densa. Esta diferença pode estar relacionada ao teor de aminoácidos presentes em ambos colágenos, conforme a Tabela 3.

Entretanto, esta disposição das fibras de colágeno não interferiu na interação com as fibras celulósicas, como pode ser visto na Figura 12.

Conforme o relatório de ensaio (CQ6217/2012) realizado pelo Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do governo de São Paulo em 2012, cedido pela empresa VellyFARM (fornecedora da pele de rã-touro para a realização deste trabalho) e pelo relato de Li e colaboradores (2003) na literatura, é possível observar o teor de aminoácidos na pele de rã-touro liofilizada (Tabela 3). Na coluna à direita da tabela, foram colocados os valores para o colágeno bovino, a fim de comparação dos mesmos.

Tabela 3 – Teor de aminoácidos presentes na pele de rã-touro e de bovinos (resultados expressos em resíduos/1000 resíduos).

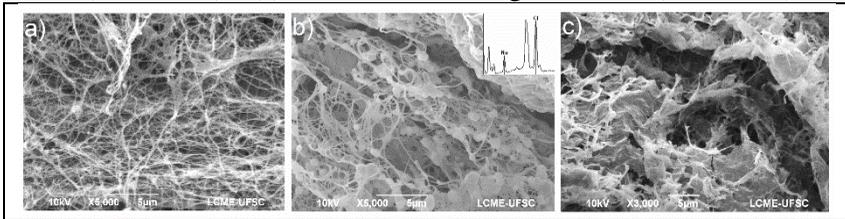
<b>Aminoácidos</b>	<b>Colágeno de rã-touro</b>	<b>Colágeno bovino</b>
Ácido aspártico	53	53
Ácido glutâmico	80	80
Serina	53	39
Glicina	300	330
Histidina	6	5
Arginina	56	50
Treonina	23	18
Alanina	119	119
Prolina	113	121
Tirosina	5	3
Valina	25	21
Metionina	5	6
Cistina	8	--
Isoleucina	11	11
Leucina	27	23
Fenilalanina	18	3
Lisina	33	26
Hidroxiprolina	54	94
Hidroxilisina	11	7

Fonte: adaptado de (Li *et al.*, 2003).

Observa-se a similaridade dos valores para a maioria dos aminoácidos apresentados na tabela. Destaca-se o conteúdo de glicina e prolina muito próximos para os colágenos bovino e de rã-touro, já que estes dois aminoácidos são os principais constituintes de colágenos. O

teor de hidroxiprolina na amostra colágena é determinante quanto à sua estabilidade da tripla hélice (Qian *et al.*, 2007). Isto confirma a temperatura de desnaturação mais baixa para o colágeno de rã-touro e a disposição distinta das fibras vista ao MEV.

Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras de (a) nanocelulose (NC); (b) nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR) e (c) nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB).



A micrografia da membrana de NC (Figura 12a) revelou a interface de uma matriz densa e porosa formada por uma estrutura tridimensional entrelaçada de nanofibras. As funções biológicas e as inúmeras aplicações da nanocelulose devem-se à distinta morfologia de suas fibras. Esta hierarquia morfológica é definida por fibrilas elementares, microfibrilas e as bandas microfibrilares (Salvi, 2010). As micrografias obtidas foram similares às encontradas por Luo e colaboradores (2008). Pértile (2007) diz que a porosidade da celulose pode variar dependendo do grau de interligação entre as microfibrilas, tornando a malha de fibras mais densa. O processo de secagem da NC também interfere na porosidade do material, sendo que quando secas em estufa, a porosidade e o tamanho dos poros diminuem consideravelmente.

Na superfície da membrana de NC/COLR (Figura 12b), pode-se observar a formação de duas fases distintas, deixando a membrana biopolimérica com superfície irregular, aspectos fibrosos na superfície e preenchimento de colágeno na estrutura de celulose. Os cristais que aparecem na micrografia correspondem à presença de NaCl proveniente da precipitação e da diálise incompleta, que foi confirmada com a análise do detector de dispersão de energia (EDS). O EDS é acoplado ao MEV a fim de analisar a pureza dos materiais gerando imagens composicionais dos elementos identificados (Santos *et al.*, 2013).

As imagens das amostras contendo colágeno de rã-touro mostraram contaminação por cristais de NaCl antes da diálise (Figura

12b), assim como para Santos e colaboradores (2013), tal como indicado pela presença dos picos de alta intensidade para estes elementos no respectivo espectro de EDS. A análise concentrou-se sobre as áreas específicas que mostraram a presença de NaCl em concentrações elevadas. Todavia, a presença do sal contribui para evitar a desnaturação proteica.

A membrana de NC/COLB (Figura 12c) se apresentou como um material poroso característico de hidrogéis, com estrutura constituída de arranjos de fibras regularmente dispostas, interconectadas nas três dimensões. O fato de o colágeno bovino puro não apresentar muitas fibras aleatórias é ressaltado no aspecto regular e de preenchimento na membrana com NC.

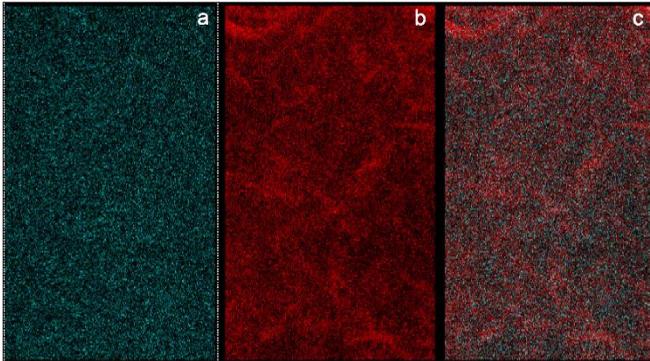
Para Luo e colaboradores (2008), as membranas biopoliméricas apresentaram nanofibrilas mais porosas, com estrutura organizada e área superficial grande, necessário à adesão das células e que permite o crescimento celular e o uso na engenharia tecidual.

Zhijiang e Guang (2011) concluem que as imagens obtidas pelo MEV mostram que as moléculas de colágeno podem penetrar na membrana de NC formando uma membrana polimérica com estrutura mista de poros interligados e com grande área de superfície.

Os substratos 3D irregulares e porosos têm sido amplamente usados para suporte de cultivo celular. O tamanho e o grau de interconexão entre os poros são pré-requisitos para permitir a invasão celular e vascular (Oliveira, 2009).

A análise morfológica utilizando a microscopia eletrônica confocal permite a visualização da distribuição dos constituintes do biomaterial produzido, bem como a disposição dos mesmos quando puros. A Figura 13 apresenta a distribuição das fibras de NC e colágeno.

Figura 13 – Imagens obtidas pela microscopia eletrônica confocal para (a) nanocelulose (corada com *Calcofluor White*), (b), colágeno de rã-touro (corado com *Sirius red*) e (c) nanocelulose e colágeno (corada com *Calcofluor White* e *Sirius red*).



A visualização da distribuição das nanofibras de celulose encontradas neste trabalho foram muito similares às encontradas por Phan *et al.* (2015), embora estes autores tenham apresentado o biomaterial com tamanho de fibras distintos. Isto deve estar relacionado à área e ao lado da membrana dos quais as imagens foram obtidas.

As imagens obtidas para ambos colágenos puros e seus biopolímeros tiveram o mesmo comportamento, já que a análise confirma ou não a presença dos biomateriais em questão.

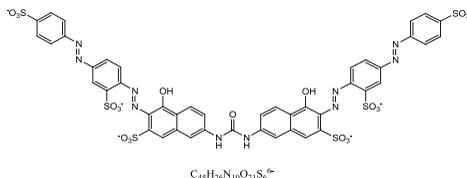
A coloração das fibras colágenas é possível devido à propriedade de anisotropia ótica do material (Aranha, 2010). Um raio de luz polarizado, ao atravessar o material, sofre o fenômeno da dupla refração, apresentando dois raios refratados: um lento e outro rápido, cujas velocidades são inversamente proporcionais aos índices de refração. A diferença numérica entre estes dois índices é chamada de birrefringência (Junqueira; Bignolas; Brentani, 1979).

Esta é uma propriedade anisotrópica ótica, podendo determinar e quantificar a ordenação macromolecular de estruturas biológicas, informando sobre a morfologia e direção das fibras, através da propagação desigual da luz. O material birrefringente apresenta um brilho intenso exibido pelas fibras, correspondentes aos índices de refração, quando são posicionadas a 45° do plano de polarização de luz. A alta intensidade de brilho é proporcional à espessura e à diferença de fase entre as frentes de luz emergentes do material em análise

(Rodrigues, 2009; Montanha, 2012). As moléculas alongadas do corante estão ligadas às fibras colágenas de tal forma que os seus eixos longitudinais são paralelos, resultando em uma birrefringência reforçada (Suzuki, 2013).

Segundo Souza (2013) e Suzuki (2013), quando estudadas sob microscopia, as fibras de colágeno do tipo I, fortemente birrefringentes, que forem coradas com *Sirius red* podem ser observadas em tons de amarelo, dourado ou vermelho. As moléculas de colágeno são ricas em aminoácidos básicos, reagindo fortemente com ácidos. O *Sirius red*, corante aniônico forte, cora o colágeno por meio da reação dos seus grupos sulfônicos (Figura 14) com os grupos básicos presentes nas moléculas colágenas (Ravichandran *et al.*, 2012). Neste trabalho, as fibras de colágeno estão coradas de vermelho, conforme visto na Figura 13 (b e c).

Figura 14 – Estrutura química do corante *Sirius red*.



Na Figura 13c é possível observar a sobreposição das colorações das fibras de nanocelulose e colágeno. Corroborando com a análise bidimensional mostrada pelas imagens 2D de microscopia eletrônica de varredura (Figura 12), as fibras de colágeno estão distribuídas uniformemente entre as fibras de NC.

Na literatura, não foram encontrados resultados similares quanto ao uso de microscopia eletrônica confocal para coloração de biopolímeros de NC e colágeno por *Sirius red*. Entretanto, Suganya e colaboradores (2014), por exemplo, utilizaram a técnica para visualizar a expressão de colágeno em biopolímero de fibroína de seda e colágeno, com resultados similares a este trabalho. As análises de microscopia foram úteis na confirmação da presença de colágeno entrelaçado às fibras celulósicas, de maneira homogênea.

### 5.2.2.2 Temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão dos biomateriais

A técnica de detecção da calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi usada para estudar o comportamento térmico do colágeno. A temperatura de transição mais elevada indica que o colágeno apresenta maior estabilidade em um ambiente de alta temperatura. A estabilidade térmica também influencia sobre a durabilidade dos biomateriais à base de colágeno. DSC é uma ótima ferramenta para a medição de temperatura e fluxo de calor associada com temperaturas de transição de fase dos materiais. Uma amostra de referência e um inerte são aquecidos/arrefecidos a uma taxa escolhida num ambiente controlado. A fim de manter a mesma temperatura entre a amostra e a referência, o fluxo de calor é aplicado à amostra. Este fluxo é gravado de modo a refletir as alterações térmicas no interior da amostra, tais como de transição vítrea, de fusão e de cristalização (Ferreira *et al.*, 2012). Na Figura 15, são apresentadas as curvas de DSC das amostras e a Tabela 4 relaciona os dados (valores) determinados a partir das curvas.

Figura 15– Curvas de DSC de nanocelulose (NC), colágeno bovino (COLB), colágeno de rã-touro (COLR), nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB) e nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR).

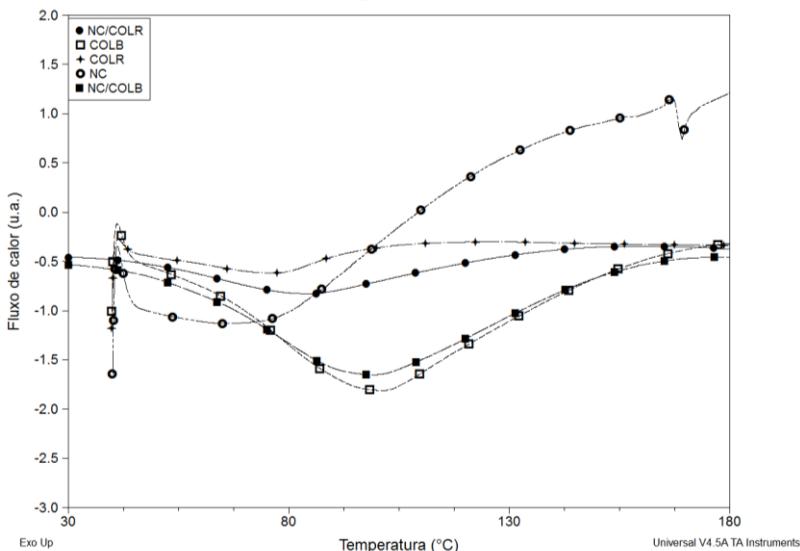


Tabela 4– Temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) e de fusão ( $T_m$ ) obtidas das curvas de DSC de nanocelulose (NC), colágeno bovino (COLB), colágeno de rã-touro (COLR), nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB) e nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR).

Amostra	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)
NC	36	-
COLB	42	102
COLR	-	79
NC/COLB	43	101
NC/COLR	-	74

A  $T_g$  de macromoléculas cristalinas como a NC é muito difícil de ser detectada, devido às largas curvas de fluxo de calor, o que faz com que qualquer desvio da linha base se torne quase indistinguível (Pértile, 2007). Para a NC pura, foi possível observar uma  $T_g$  em 36 °C, similar ao encontrado por Pértile(2007), igual a 35,5 °C.

Assim como para Tonhi e Plepis (2002), a  $T_g$  (ou temperatura de desnaturação) do COLB foi de 42 °C, já que ambos são de fonte bovina. Não foi possível observar a  $T_g$  para a amostra de COLR nesta análise, haja vista que a curva inicia em 40 °C, bem abaixo da esperada. Todavia, este dado já foi obtido pela análise vista no item 4.2.5 (Temperatura de desnaturação do colágeno), na etapa de caracterização inicial da amostra. A  $T_g$  da NC/COLB foi similar à do colágeno puro.

Os dados de temperatura de fusão obtidos pela análise indicam que ocorre decomposição do colágeno a partir de 74 °C para o COLR e de 101 °C para o COLB. Para a aplicação desejada, ou seja, ao uso para cicatrização de feridas, conclui-se que estes valores são relevantes porque estão bem acima da temperatura corpórea.

### 5.2.2.3 Estabilidade térmica dos biomateriais

A análise termogravimétrica (TG) é um processo contínuo, que envolve a medição da massa da amostra em conformidade com o aumento da temperatura sob a forma de aquecimento programado. Tendo em vista que a TG proporciona melhor compreensão do

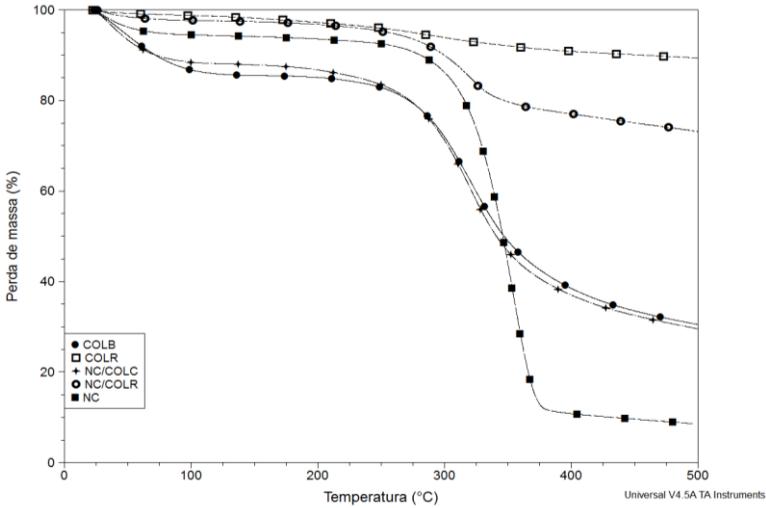
comportamento da estabilidade e da decomposição térmica (Kim *et al.*, 2011), estas características foram investigadas e descritas na

Figura 16–Curvas TG/DTG para nanocelulose (NC); colágeno bovino (COLB); colágeno de rã-touro (COLR); nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB); e nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR): a) perda de massa (%) (TG) e b) perda de massa (%)/temperatura (°C)(DTG).

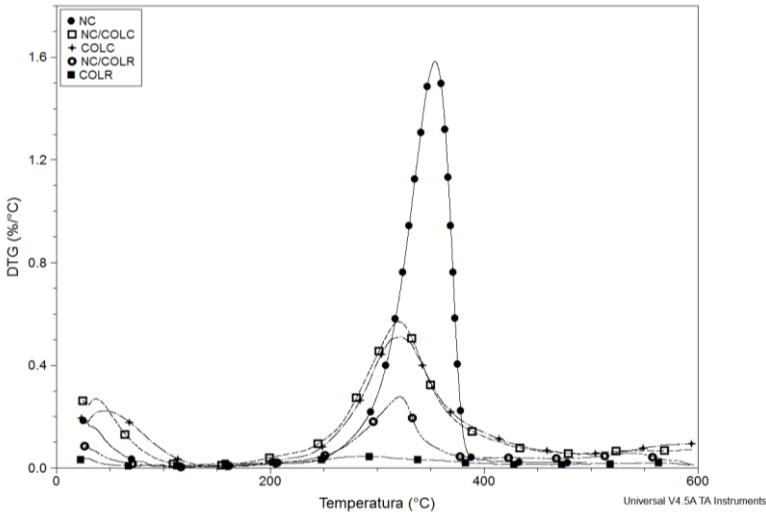
e Tabela 5.

A termogravimetria diferencial (DTG) é uma técnica que fornece a primeira derivada da curva TG, em função do tempo ou da temperatura. A curva DTG apresenta esta informação de uma maneira mais visualmente acessível, visto que as curvas de DTG não contêm mais informações do que as de TG. A DTG indica exatamente as temperaturas do começo, da taxa máxima e a temperatura do final da mudança. O pico corresponde ao evento de maior perda de massa que ocorreu durante todo o processo de aquecimento de cada amostra(Moraes, 2013).

Figura 16–Curvas TG/DTG para nanocelulose (NC); colágeno bovino (COLB); colágeno de rã-touro (COLR); nanocelulose e colágeno bovino (NC/COLB); e nanocelulose e colágeno de rã-touro (NC/COLR): a) perda de massa (%) (TG) e b) perda de massa (%)/temperatura (°C)(DTG).



(a)



(b)

Tabela 5 – Temperatura de degradação térmica ( $T_{\text{onset}}$ ) e temperatura máxima de degradação ( $T_{\text{máx}}$ ) das amostras obtidas por TG.

<b>Amostra</b>	<b>NC</b>	<b>COLR</b>	<b>COLB</b>	<b>NC/COLR</b>	<b>NC/COLB</b>
$T_{\text{onset } 1}$ (°C)	-	36	39	43	45
$T_{\text{máx } 1}$ (°C)	-	47	84	57	68
Perda de massa $_1$ (%)	6,7	1,27	14,8	2,4	11,8
$T_{\text{onset } 2}$ (°C)	322	236	281	282	278
$T_{\text{máx } 2}$ (°C)	363	327	352	332	333
Perda de massa $_2$ (%)	91,3	12,3	76,7	30,9	76,7

A curva obtida para a membrana de NC geralmente mostra dois eventos significativos de perda de massa, sendo o primeiro observado entre a temperatura ambiente e 100 °C associado à perda de água e de proteínas; o segundo, observado em  $T_{\text{onset}}$  igual a 322 °C. Foi observado o primeiro evento para a amostra, indicando que não foi realizada uma remoção efetiva da matéria proteica e de outros ingredientes do meio de cultura por meio da purificação por tratamento com solução alcalina (Hassan *et al.*, 2013).

Segundo Mohammadkazemi; Azin e Ashori (2015), a NC apresenta um segundo evento de perda de massa, que é atribuído a um processo de decomposição a temperaturas entre 200 e 250 °C. Entre 360-390 °C, a decomposição das amostras resultou numa perda de massa significativa (70-80%). Este caso também pode estar associado à degradação da celulose, incluindo despolimerização, desidratação e decomposição de unidades glicosídicas, seguido pela formação de um resíduo de carbono, como citado por Salvi (2010) e Stumpf (2012). A temperatura máxima de decomposição é um critério de estabilidade térmica.

Os dados de TG mostraram que a membrana de NC/COLB apresentou a estabilidade térmica mais baixa, com  $T_{\text{onset}}$  em 300 °C, cerca de 33 a 35 °C inferior à  $T_{\text{onset}}$  da NC. A membrana de NC/COLB apresentou comportamento similar ao colágeno puro.

As membranas biopoliméricas apresentaram o mesmo comportamento no que tange à estabilidade térmica, todavia, a perda de massa foi muito distinta. Isto indica que a incorporação do colágeno nas membranas foi realizada da mesma maneira para ambas e que a utilização do colágeno de rã-touro é viável segundo esta técnica.

Observa-se que a membrana de NC/COLR absorveu a menor quantidade de água (2,4%) e apresentou estabilidade térmica similar à

membrana de NC/COLB, com  $T_{\text{onset}}$  em 282 °C e 278 °C, respectivamente.

O valor da perda de massa final das amostras envolvendo colágeno bovino foi o mesmo, similar ao encontrado por Amsaveni e colaboradores (2013), indicando que a presença de celulose não influenciou no resultado final, o que não aconteceu nas amostras com colágeno de rã-touro.

Moraes (2013) observou a temperatura máxima para o COLB a 325 °C, similar à encontrada para o COLR (327 °C). Além disso, o COLR absorve 1,27% de água, inferior ao percentual de água absorvida pelo COLB (14,8%). Esta absorção de água inicial é interessante à aplicação em cicatrização de feridas, uma vez que está intimamente ligada à absorção do excesso de exsudato (Li *et al.*, 2014).

A presença de NC no biomaterial com COLR aumentou a temperatura de início de degradação, provavelmente pela boa interação entre os materiais. Lin e Liu (2006) relataram que a temperatura de degradação mais elevada influencia sobre a durabilidade dos biomateriais e indica que o colágeno apresenta maior estabilidade num ambiente de alta temperatura, embora a aplicação para cicatrização de feridas não necessite de altas temperaturas. Similar aos resultados de Saska e colaboradores (2012), a temperatura de degradação das membranas biopoliméricas é menor que a da NC. Este comportamento é associado à cisão de ligações de hidrogênio e a redução da cristalinidade da NC pela incorporação de colágeno.

#### **5.2.2.4 Caracterização dos grupamentos funcionais dos biomateriais**

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância atenuada (FTIR-ATR) é um dos métodos mais rápidos e eficazes de caracterização dos grupamentos funcionais de um composto químico e se aplica tanto à análise qualitativa quanto à quantitativa de sólidos, líquidos ou gases. As quantidades de analito usadas são pequenas (da ordem de miligramas ou fração); a amostra não é destruída no ensaio e pode ser recuperada após a medida do espectro (Mazur, 2012; Moraes, 2013). A análise permite observar moléculas orgânicas e inorgânicas na faixa de número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Essa técnica produz informações sobre a vibração das unidades atômicas e moleculares (Campos, 2008).

A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** apresenta os espectros de FTIR-ATR das amostras de nanocelulose, colágeno de rã-touro e bovino, bem como os espectros das membranas biopoliméricas.

Figura 17 – Espectros de FTIR-ATR das amostras de nanocelulose (NC), colágeno de rã-touro (COLR), colágeno bovino (COLB) e membranas híbridas de NC/COLR e NC/COLB.

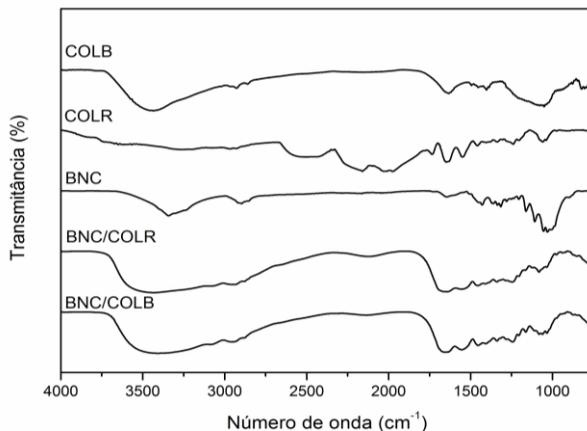


Tabela 6 – Dados obtidos dos espectros de FTIR-ATR das amostras de nanocelulose (NC), colágeno de rã-touro (COLR), colágeno bovino (COLB) e membranas de NC/COLR e NC/COLB.

	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )				
	NC	COLB	COLR	NC/COLB	NC/COLR
Estiramento dos grupos -OH	3500	-	-	3394	3453
Estiramento C-H de alcanos e assimétrico CH <sub>2</sub>	2897	-	-	2882	2888
Amida I (absorção de C=O, associada à estrutura secundária proteica)	-	1652	1651	1665	1651
Amida II (deformação N-H e estiramento da ligação C-N)	-	1523	1560	1560	1560
Amida III (estiramento C-N e deformação N-H)	-	1293	1235	1242	1250

Comparando os espectros de FTIR para a NC, a banda larga na região de  $3500\text{ cm}^{-1}$  é característica do estiramento dos grupos hidroxilas presentes na celulose (Luo *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). Assim como para Lin *et al.* (2013) e Castro *et al.* (2014), no espectro da NC foram encontradas bandas a  $2897\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento C-H de alcanos e de  $\text{CH}_2$  assimétrico; e a  $1030\text{ cm}^{-1}$ , que diz respeito ao estiramento da ligação C-O-C.

Muyonga; Cole e Duodu (2004) e Yan e colaboradores (2008) obtiveram espectros das amostras de colágeno píceo do tipo I similares aos encontrados neste trabalho. Identificam-se as bandas de amida A em  $3300$  e  $3436\text{ cm}^{-1}$  para os colágenos de rã-touro e bovino, respectivamente, e em  $3434\text{ cm}^{-1}$  para as referências citadas. Segundo Singh *et al.* (2011), a ligação N-H ocorre no intervalo de  $3400$  a  $3440\text{ cm}^{-1}$  (Amida A) e quando o grupo N-H de um peptídeo está envolvido em uma ligação de hidrogênio, a posição é deslocada para frequências mais baixas, geralmente em torno de  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Para a amida B ( $2935\text{ cm}^{-1}$ ), relacionada com o grupo  $\text{CH}_2$ , foram observadas as bandas a  $2900$  (COLB) e a  $2950\text{ cm}^{-1}$  (COLR) para os colágenos puros e nas membranas biopoliméricas, o valor obtido foi de  $2950\text{ cm}^{-1}$  para ambas.

A posição da banda da amida I é a de absorção de C=O, associada à estrutura secundária da proteína (Yan *et al.*, 2008). As bandas que comprovam a presença da amida I nas amostras com colágeno estão na faixa de  $1600$ - $1700\text{ cm}^{-1}$  (Wang; Zhu; Du, 2011), sendo que para o COLB foi encontrada a  $1652\text{ cm}^{-1}$ ; para o COLR foi a  $1651\text{ cm}^{-1}$ ; e nas membranas biopoliméricas foi possível observar a  $1665\text{ cm}^{-1}$  (NC/COLB) e a  $1651\text{ cm}^{-1}$  (NC/COLR). Destaca-se que nos biopolímeros houve deslocamento de banda, significando maior interação.

A banda atribuída à amida II é mista, resultante da deformação N-H e estiramento da ligação C-N e observada a  $1560\text{ cm}^{-1}$ . Para as amostras de colágeno puro, verificaram-se as bandas a  $1523\text{ cm}^{-1}$  (COLB) e a  $1560\text{ cm}^{-1}$  (COLR). E nas membranas biopoliméricas, foi obtido o valor de  $1560\text{ cm}^{-1}$ . A região a  $1235\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à amida III (relacionadas com as vibrações de estiramento C-N e deformação N-H). A frequência obtida para o COLR foi de  $1235\text{ cm}^{-1}$  e para o COLB foi  $1293\text{ cm}^{-1}$ . Já os biopolímeros apresentaram resultados de  $1242\text{ cm}^{-1}$  (NC/COLB) e  $1250\text{ cm}^{-1}$  (NC/COLR) (Belbachir *et al.*, 2009; Wang; Zhu; Du, 2011; Albu *et al.*, 2014).

Para a membrana deNC com COLB, observam-se os picos a 3394 e a 2882  $\text{cm}^{-1}$ . Para a combinação com COLR, foram encontrados a 3453 e a 2888  $\text{cm}^{-1}$ . O deslocamento e a amplificação destas bandas comparado à NC se deve provavelmente à combinação das vibrações de alongamento das ligações de O-H e N-H, como encontrados em *Albu et al.* (2014).

Além disso, ressalta-se que a relação de transmitância de  $T_{1434}/T_{1234}$  para as amostras de colágeno puro foi de aproximadamente 1,0, o que indica que a estrutura helicoidal tripla do colágeno foi preservada e está intacta (Pati; Adhikari; Dhara, 2010; Mandal *et al.*, 2012). Se o valor for significativamente menor e próximo de 0,6, o colágeno pode ter desnaturado e virado gelatina.

Mediante estes resultados, observa-se que o COLR apresenta as bandas que comprovem a origem colágena, comparado ao COLB. O ensaio realizado com as membranas biopoliméricas produzidas comprova a presença das bandas correspondentes à NC e ao colágeno.

## 5.3 EFEITO DO COLÁGENO NA MIGRAÇÃO E INVASÃO DE QUERATINÓCITOS

### 5.3.1 Ensaio de migração celular

A migração dos queratinócitos quando na presença de colágeno de rã-touro e bovino, nos tempos de 0 e 48 h, pode ser observada nas figuras abaixo. A diminuição da área da ferida ao longo de 48 h foi vista nas Figuras 18 e 20, na forma de uma observação representativa. A demonstração dos dados deste ensaio de migração celular *in vitrose* encontra nas Figuras 19 e 21.

Figura 18 – Observação representativa da migração de queratinócitos induzidos pela presença de colágeno nas amostras controle e de NC/COLRa ( $38,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), NC/COLRb ( $95,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e NC/COLRc ( $273,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

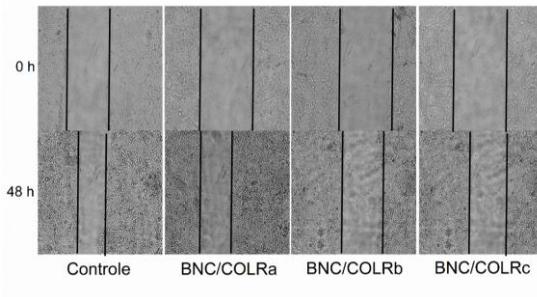


Figura 19 – Taxa de migração de queratinócitos correspondente à NC, NC/COLRa ( $38,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), NC/COLRb ( $95,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e NC/COLRc ( $273,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). (As letras iguais apresentam significância diferente de  $p < 0,005$ ).

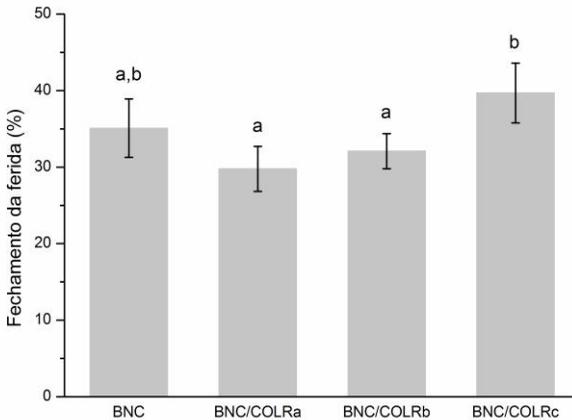


Figura 20– Observação representativa da migração de queratinócitos induzidos pela presença de colágeno nas amostras controle e de COLBa ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLBb ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLBc ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRa ( $38,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRb ( $95,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e COLRc ( $273,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

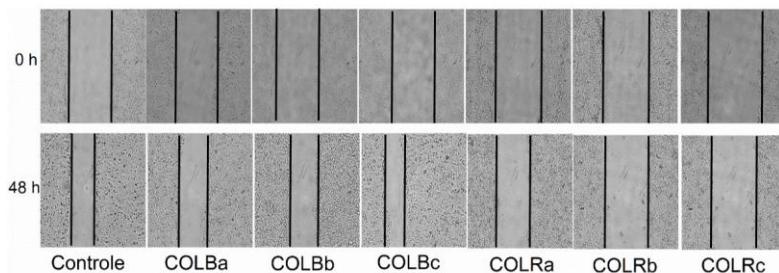
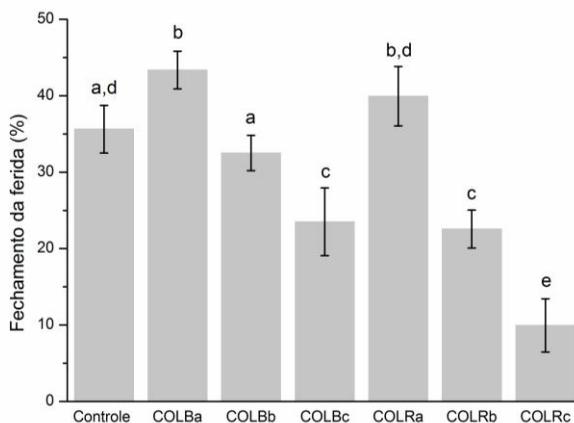


Figura 21 – Taxa de migração de queratinócitos correspondente ao controle, COLBa ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLBb ( $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLBc ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRa ( $38 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), COLRb ( $95 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e COLRc ( $273 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). (As letras iguais apresentam significância diferente de  $p < 0,005$ ).



Analisando as Figuras 18 e 19, conclui-se que a presença de colágeno é relevante na aceleração do fechamento da ferida. Observou-se que a concentração de colágeno influencia diretamente na diminuição da área. A presença de baixas concentrações colágenas permite que os queratinócitos migrem mais rapidamente do que em altas.

Rezazade Bazaz (2013) realizou testes *in vivo* em ratos com a pele de rã-touro liofilizada aplicada sobre as feridas e observou que esta acelerou o processo de cicatrização devido à presença de lipídios e colágeno na mesma. Estes dados sugerem que a utilização do colágeno da pele de rã-touro induz ao fechamento da ferida.

Comparando os resultados da área fechada da ferida de COLBa ( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e COLRa ( $38 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), observa-se que estatisticamente ambos são iguais, mesmo que a concentração de COLRa seja cerca de 26 vezes menor que a de COLBa. Esta diferença de concentração está associada à presença de impurezas tanto no colágeno bovino quanto no de rã-touro, considerando os dados obtidos pela análise de proteínas totais pelo método de Lowry e de colágeno por meio do corante *Sirius red*. Considera-se relevante a utilização do colágeno de rã-touro em substituição ao colágeno bovino.

A porcentagem do fechamento de ferida foi relatada na Figura 21, quando os biopolímeros foram adicionados sobre os queratinócitos. Considerando os valores de incorporação do colágeno descritos no item 4.3.2, as membranas contendo  $273,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de COLR (NC/COLRc) apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) quando houve a comparação com as membranas contendo  $38,5$  e  $95,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (NC/COLRa e NC/COLRb, respectivamente). Porém, isto não foi observado quando estas foram comparadas com o controle (NC).

O fechamento da ferida realizado pelas membranas biopoliméricas variou conforme a concentração de colágeno incorporado. Isto é, a NC/COLRc ( $273,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) diminuiu a área ferida mais rapidamente do que as outras (Figura 20).

Não foram encontrados registros na literatura sobre o ensaio de migração celular *in vitro* utilizando colágeno de rã-touro e nanocelulose.

O comportamento de células cutâneas pode ser investigado com o uso de cultura de células, como os queratinócitos (Keira *et al.*, 2004). Em tecidos normais, o colágeno fornece a força, a integridade e a estrutura. Quando os tecidos são rompidos após a ferida, o colágeno é necessário para reparar o defeito e restabelecer a estrutura anatômica e a função. O colágeno tem sido um dos materiais mais utilizados na medicina para reparação do dano ou trauma químico-mecânico, da pele ou mucosas devido à sua biocompatibilidade e sua capacidade de promover cicatrização de feridas. Ainda não há indicações claras do seu mecanismo de ação, mas acredita-se que seja promovido pela sua nanoestrutura característica, que proporciona condições favoráveis para

a cura de feridas e regeneração tecidual. Desta forma, novos estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários, pois poderão promover o entendimento de sua interação com os tecidos (Wanet *al.*, 2007).

Como reportado por Osman e colaboradores (2007) e Muangman (2011), o potencial de cicatrização da NC é evidenciado por meio destes resultados. Ressalta-se que a porcentagem é estatisticamente igual à demonstrada pelas membranas biopoliméricas. Lin e colaboradores (2013) realizaram testes *in vitro* com membranas de nanocelulose e quitosana e foi observada a reparação tecidual de 30% a 48 h. Souza (2013) realizou testes *in vivo* utilizando membranas de nanocelulose e colágeno bovino e a reparação tecidual em 72 h foi de 20%. Comparado a estes, o produto biopolimérico desenvolvido neste trabalho pode se tornar mais promissor quando aplicado em animais e humanos, uma vez que em 48 h foi observada uma porcentagem de migração celular de aproximadamente 40%.



## 6 CONCLUSÕES

- Foi possível extrair o colágeno presente na pele de rã-touro, com resultados similares aos da literatura, quanto à massa seca liofilizada ao fim do processo. Ressalta-se a viabilidade de extração quanto ao custo, já que os comerciais são extremamente caros;
- As proteínas totais e o colágeno foram quantificados após a extração, ressaltando a quantificação como o diferencial deste trabalho;
- O perfil eletroforético foi caracterizado e é característico de colágeno tipo I e a temperatura de desnaturação encontrada é característica de anfíbios;
- Coberturas foram formadas por nanocelulose e colágeno de rã-touro, obtendo-se um biomaterial com as melhores características de ambos;
- As análises 2D e 3D de microestrutura comprovam o entrelaçamento de ambos os colágenos entre as fibras de nanocelulose, quando na forma combinada;
- As análises térmicas indicam que as amostras apresentam estabilidade necessária à aplicação como cobertura de feridas;
- A caracterização dos grupos funcionais confirma as bandas características do colágeno extraído e, a interação destes com a nanocelulose e comprova que a extração do colágeno manteve a estrutura helicoidal tripla intacta;
- Foi verificado que baixas concentrações de colágeno de rã-touro em solução e o uso do biomaterial de nanocelulose e colágeno de rã-touro na maior concentração utilizada aceleram o fechamento da ferida;
- Perguntas de pesquisa → é possível substituir o colágeno bovino pelo colágeno de rã-touro com sucesso à área de cicatrização de feridas.



## REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND, A. **Comparative study between different methods of collagen extraction from fish and its properties.** World Applied Sciences Journal, v. 16, n. 3, p. 316-319, 2012.
- ALBU, M. G.; VULUGA, Z.; PANAITESCU, D. M.; VULUGA, D. M.; CASARICA, A.; GHIUREA, M. **Morphology and thermal stability of bacterial cellulose/collagen composites.** Central European Journal of Chemistry, v. 12, n. 9, p. 968-975, 2014.
- ALMEIDA, I. F.; PEREIRA, T.; SILVA, N. H. C. S.; GOMES, F. P.; SILVESTRE, A. J. D.; FREIRE, C. S. R.; SOUSA LOBO, J. M.; COSTA, P. C. **Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An *in vivo* skin compatibility study.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 86, n. 3, p. 332-36, 2014.
- AMSAVENI, M.; ANUMARY, A.; ASHOKKUMAR, M.; CHANDRASEKARAN, B.; THANIKAIVELAN, P. **Green synthesis and characterization of hybrid collagen-cellulose-albumin biofibers from skin waste.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 171, n. 6, p. 1500-12, 2013.
- ARANHA, M. A. **Avaliação quantitativa das fibras colágenas tipo I e tipo III, do tecido uretral de ratas submetidas à simulação de trabalho de parto e ooforectomia.** 2010. 62 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- ARO, A. A. **Efeito dos extratos de *Aloe vera* e *Arrabidaea chica* sobre a cicatrização do tendão calcâneo de ratos após transecção parcial.** 2012. 192 f. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- AUKKANIT, N.; GARNJANAGOONCHORN, W. **Temperature effects on type I pepsin-solubilised collagen extraction from silver-line grunt skin and its *in vitro* fibril self-assembly.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 90, n. 15, p. 2627-32, 2010.
- BACKDAHL, H.; ESGUERRA, M.; DELBRO, D.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. **Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds.** Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, v. 2, n. 6, p. 320-30, 2008.
- BALAN, V.; VERESTIUC, L. **Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review.** European Polymer Journal, v. 53, p. 171-188, 2014.
- BELBACHIR, K.; NOREEN, R.; GOUSPILLOU, G.; PETIBOIS, C. **Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 395, n. 3, p. 829-37, 2009.
- BET, M.R.; GOISSIS, G.; VARGAS, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. **Cell adhesion and cytotoxicity studies over polyanionic collagen surfaces with variable negative charge and wettability.** Biomaterials, v. 24, n. 1, p. 191-137, 2003.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. **Cicatrização de feridas.** Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo), v. 20, p. 51-58, 2007.

- CAMPOS, D. M. **Produção e caracterização de colágeno tipo I e de compósitos hidroxiapatita-colágeno para regeneração óssea**. 2008. 100 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- CASTRO, C.; VESTERINEN, A.; ZULUAGA, R.; CARO, G.; FILPPONEN, I.; ROJAS, O. J.; KORTABERRIA, G.; GANAN, P. **In situ production of nanocomposites of poly(vinyl alcohol) and cellulose nanofibrils from *Gluconacetobacter* bacteria: effect of chemical crosslinking**. *Cellulose*, v. 21, n. 3, p. 1745-1756, 2014.
- CHAI, H. J.; LI, J. H.; HUANG, H. N.; LI, T. L.; CHAN, Y. L.; SHIAU, C. Y.; WU, C. J. **Effects of sizes and conformations of fish-scale collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency**. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 757301, 2010.
- CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. **Microbial cellulose: fermentative production and applications**. *Food Technology and Biotechnology*, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
- CHENG, F. Y.; HSU, F. W.; CHANG, H. S.; LIN, L. C.; SAKATA, R. **Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet**. *Food Chemistry*, v. 113, n. 2, p. 563-567, 2009.
- CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G. B.; CHANDRAKASAN, G. **Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats**. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 181, n. 1-2, p. 71-6, 1998.
- CHONG, E. J.; PHAN, T. T.; LIM, I. J.; ZHANG, Y. Z.; BAY, B. H.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C. T. **Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution**. *Acta biomaterialia*, v. 3, n. 3, p. 321-30, 2007.
- CHUNG, E. J.; JAKUS, A. E.; SHAH, R. N. **In situ forming collagen-hyaluronic acid membrane structures: mechanism of self-assembly and applications in regenerative medicine**. *Acta biomaterialia*, v. 9, n. 2, p. 5153-61, 2013.
- CORY, G. **Scratch-wound assay**. *Cell Migration: Springer*, v. 769, p.25-30. 2011.
- EMING, S. A.; BRACHVOGEL, B.; ODORISIO, T.; KOCH, M. **Regulation of angiogenesis: wound healing as a model**. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, v. 42, n. 3, p. 115-170, 2007.
- ESTCOURT, M. J.; RAMSHAW, I. A.; RAMSAY, A. J. **Cytokine responses in virus infections: effects on pathogenesis, recovery and persistence**. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, n. 4, p. 411-418, 1998.
- FALEIRO, C. C.; ELIAS, S. T. H.; CAVALCANTI, L. C.; CAVALCANTI, A. S. S. **O extrato das folhas de babosa *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo**. *Natureza on line*, v. 7, p. 56-60, 2009.
- FERREIRA, A. M.; GENTILE, P.; CHIONO, V.; CIARDELLI, G. **Collagen for bone tissue regeneration**. *Acta biomaterialia*, v. 8, n. 9, p. 3191-200, 2012.
- FERREIRA, D. S.; JÚNIOR, P. E. A.; MAIA, C. S.; SILVA, W. E.; FRANÇA, D. F.; MORAES, E. F.; TEIXEIRA, A. A. C. **Caracterização histológica da pele de rã-touro (*Rana catesbeiana*, SHAW 1802)**. *Biológico*, v. 68, p. 239-243, 2006.

- FERREIRA, F. V.; PAULA, L. B. **Sulfadiazina de prata versus medicamentos fitoterápicos: estudo comparativo dos efeitos no tratamento de queimaduras**. Revista Brasileira de Queimaduras, v. 12, n. 3, p. 132-139, 2013.
- FONG, E. **Wound healing on artificial extracellular matrix proteins**. 2010. Tese de Doutorado - California Institute of Technology, Pasadena, Califórnia.
- FRIESS, W. **Collagen--biomaterial for drug delivery**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 45, n. 2, p. 113-36, 1998.
- FU, L. N.; ZHANG, Y.; LI, C.; WU, Z. H.; ZHUO, Q.; HUANG, X.; QIU, G. X.; ZHOU, P.; YANG, G. **Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method**. Journal of Materials Chemistry, v. 22, n. 24, p. 12349-12357, 2012.
- GAUTAM, S.; CHOU, C. F.; DINDA, A. K.; POTDAR, P. D.; MISHRA, N. C. **Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold with collagen type I grafting for skin tissue engineering**. Materials science & engineering C, Materials for biological applications, v. 34, p. 402-9, 2014.
- GEORGE, J.; ONODERA, J.; MIYATA, T. **Biodegradable honeycomb collagen scaffold for dermal tissue engineering**. Journal of Biomedical Materials Research A, v. 87, n. 4, p. 1103-11, 2008.
- GOMATHI, K.; GOPINATH, D.; RAFIUDDIN AHMED, M.; JAYAKUMAR, R. **Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat**. Biomaterials, v. 24, n. 16, p. 2767-72, 2003.
- GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; GOMATHI, K.; CHITRA, K.; SEHGAL, P. K.; JAYAKUMAR, R. **Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films**. Biomaterials, v. 25, n. 10, p. 1911-7, 2004.
- GUO, B. L.; GLAVAS, L.; ALBERTSSON, A. C. **Biodegradable and electrically conducting polymers for biomedical applications**. Progress in Polymer Science, v. 38, n. 9, p. 1263-1286, 2013.
- GUO, S.; DIPIETRO, L. A. **Factors affecting wound healing**. Journal of Dental Research, v. 89, n. 3, p. 219-29, 2010.
- GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. **Wound repair and regeneration**. Nature, v. 453, n. 7193, p. 314-21, 2008.
- HASSAN, T. A.; RANGARI, V. K.; RANA, R. K.; JEELANI, S. **Sonochemical effect on size reduction of CaCO<sub>3</sub> nanoparticles derived from waste eggshells**. Ultrason Sonochem, v. 20, n. 5, p. 1308-15, 2013.
- HAYASHI, Y.; YAMADA, S.; YANAGI GUCHI, K.; KOYAMA, Z.; IKEDA, T. **Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine**. Advances in Food and Nutrition Research, v. 65, p. 107-20, 2012.
- HECK, D. **Avaliação da associação células-tronco mesenquimais de placenta humana em biomateriais baseados em celulose bacteriana**. 2012. 86 f. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.
- HONG, L.; WANG, Y. L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; GAO, C.; WAN, Y. Z. **Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route**. Materials Letters, v. 60, n. 13-14, p. 1710-1713, 2006.

- HU, W.; CHEN, S.; YANG, J.; LI, Z.; WANG, H. **Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites.** Carbohydrate Polymers, v. 101, p. 1043-60, 2014.
- HU, Y.; CATCHMARK, J. M.; VOGLER, E. A. **Factors impacting the formation of sphere-like bacterial cellulose particles and their biocompatibility for human osteoblast growth.** Biomacromolecules, v. 14, n. 10, p. 3444-52, 2013.
- HUANG, Y.; ZHU, C. L.; YANG, J. Z.; NIE, Y.; CHEN, C. T.; SUN, D. P. **Recent advances in bacterial cellulose.** Cellulose, v. 21, n. 1, p. 1-30, 2014.
- ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÉGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. **Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica.** Revista de Medicina, v. 89, n. 3/4, 2012a.
- ISAAC, C.; PAGGIARO, A. O.; ALDUNATE, J. L. C. B.; HERSON, M. R.; ALTRAN, S. C.; MÓNICA BEATRIZ, M.; FERREIRA, M. C. **Role of keratinocytes in wound contraction: an impact assessment using a model of collagen matrix populated with fibroblasts.** Revista Brasileira de Cirurgia Plástica, v. 26, n. 3, p. 402-406, 2011.
- ISAAC, C.; REGO, F. M. P.; LADEIR, P. R. S.; ALTRAM, S. C.; OLIVEIRA, R. C.; ALDUNATE, J. L. C. B.; PAGGIARO, A. O.; FERREIRA, M. C. **Construction of a skin substitute composed of porcine collagen matrix populated with human dermal fibroblasts and keratinocytes: histological evaluation.** Revista Brasileira de Cirurgia Plástica, v. 27, n. 4, p. 503-508, 2012b.
- JITHENDRA, P.; RAJAM, A. M.; KALAIVANI, T.; MANDAL, A. B.; ROSE, C. **Preparation and characterization of *Aloe vera* blended collagen-chitosan composite scaffold for tissue engineering applications.** Acs Applied Materials & Interfaces, v. 5, n. 15, p. 7291-7298, 2013.
- JUNQUEIRA, L. C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. **Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections.** Histochem Journal, v. 11, n. 4, p. 447-55, 1979.
- KEIRA, S. M.; FERREIRA, L. M.; GRAGNANI, A.; DUARTE, I. S.; BARBOSA, J. **Experimental model for collagen estimation in cell culture.** Acta Cirurgica Brasileira, v. 19, p. 17-22, 2004.
- KHAN, S. B.; QIAN, Z. J.; RYU, B.; KIM, S. K. **Isolation and Biochemical Characterization of Collagens from Seaweed Pipefish, *Syngnathus Schlegeli*.** Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 14, n. 4, p. 436-442, 2009.
- KIM, J.; CAI, Z. J.; LEE, H. S.; CHOI, G. S.; LEE, D. H.; JO, C. **Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application.** Journal of Polymer Research, v. 18, n. 4, p. 739-744, 2011.
- KIM, J. J.; EVANS, G. R. **Applications of biomaterials in plastic surgery.** Clinics in Plastic Surgery, v. 39, n. 4, p. 359-76, 2012.
- KIRSCHNER, C. M.; ANSETH, K. S. **Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments.** Acta Materialia, v. 61, n. 3, p. 931-944, 2013.

- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HEBLER, N.; HORNUNG, M.; SCHMAUDER, H. P.; MARSCH, S. **Nanocelluloses as innovative polymers in research and application**. In: (Ed.). Polysaccharides II: Springer, p.49-96. 2006.
- KUMAR, K. V. S. S.; SAI, K. P.; BABU, M. **Application of frog (*Rana tigrina Daudin*) skin collagen as a novel substrate in cell culture**. Journal of Biomedical Materials Research, v. 61, n. 2, p. 197-202, 2002.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. **Biomedical applications of collagen**. International Journal of Pharmaceutics, v. 221, n. 1-2, p. 1-22, 2001.
- LESIAK-CYGANOWSKA, E.; JANKOWSKA-STEIFER, E.; KOWALEWSKI, C.; KOMENDER, J. **Estimation of interaction between human keratinocytes and xenogenic collagen *in vitro***. Cell and tissue banking, v. 7, n. 1, p. 39-46, 2006.
- LI, C. M.; ZHONG, Z. H.; WAN, Q. H.; ZHAO, H. L.; GU, H. F.; XIONG, S. B. **Preparation and thermal stability of collagen from scales of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)**. European Food Research and Technology, v. 227, n. 5, p. 1467-1473, 2008.
- LI, H.; LIU, B. L.; CHEN, H. L.; GAO, L. Z. **A new kind of biomaterials - Bullfrog skin collagen**. Chinese Chemical Letters, v. 14, 2003.
- LI, H.; LIU, B. L.; GAO, L. Z.; CHEN, H. L. **Studies on bullfrog skin collagen**. Food Chemistry, v. 84, n. 1, p. 65-69, 2004.
- LI, Y.; QING, S.; ZHOU, J.; YANG, G. **Evaluation of bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials**. Carbohydrate Polymers, v. 103, p. 496-501, 2014.
- LI, Z. R.; WANG, B.; CHI, C. F.; ZHANG, Q. H.; GONG, Y. D.; TANG, J. J.; LUO, H. Y.; DING, G. F. **Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*)**. Food hydrocolloids, v. 31, n. 1, p. 103-113, 2013.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. ***In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro***. Nature Protocols, v. 2, n. 2, p. 329-33, 2007.
- LIMA, C. C.; PEREIRA, A. P.; SILVA, J. R.; OLIVEIRA, L. S.; RESCK, M. C.; GRECHI, C. O.; BERNARDES, M. T.; OLIMPIO, F. M.; SANTOS, A. M.; INCERPI, E. K.; GARCIA, J. A. **Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rats**. Brazilian Journal of Biology, v. 69, n. 4, p. 1195-201, 2009.
- LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H. J.; YU, C. M.; HSU, S. H. **Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications**. Carbohydrate Polymers, v. 94, n. 1, p. 603-11, 2013.
- LIN, Y. K.; CHEN, K. H.; OU, K. L.; LIU, M. **Effects of different extracellular matrices and growth factor immobilization on biodegradability and biocompatibility of macroporous bacterial cellulose**. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, v. 26, n. 5, p. 508-518, 2011.

- LIN, Y. K.; LIU, D. C. **Comparison of physical–chemical properties of type I collagen from different species**. Food Chemistry, v. 99, n. 2, p. 244-251, 2006.
- LIU, G.; WANG, X.; SUN, X.; DENG, C.; ATALA, A.; ZHANG, Y. **The effect of urine-derived stem cells expressing VEGF loaded in collagen hydrogels on myogenesis and innervation following after subcutaneous implantation in nude mice**. Biomaterials, v. 34, n. 34, p. 8617-29, 2013.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. Journal of Biological Chemistry, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.
- LUO, H. L.; XIONG, G. Y.; HUANG, Y.; HE, F.; WANG, W.; WAN, Y. Z. **Preparation and characterization of a novel COL/BC composite for potential tissue engineering scaffolds**. Materials Chemistry and Physics, v. 110, n. 2-3, p. 193-196, 2008.
- MA, L.; GAO, C.; MAO, Z.; ZHOU, J.; SHEN, J.; HU, X.; HAN, C. **Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering**. Biomaterials, v. 24, n. 26, p. 4833-41, 2003.
- MA, L.; GAO, C. Y.; MAO, Z. W.; ZHOU, J.; SHEN, J. C. **Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges**. Biomaterials, v. 25, n. 15, p. 2997-3004, 2004.
- MANDAL, A.; MEDA, V.; ZHANG, W. J.; FARHAN, K. M.; GNANAMANI, A. **Synthesis, characterization and comparison of antimicrobial activity of PEG/TritonX-100 capped silver nanoparticles on collagen scaffold**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 90, n. 0, p. 191-196, 2012.
- MARTINS, J. M. **Uso da babosa (*Aloe vera*) na reparação de feridas abertas provocadas cirurgicamente em cães**. 2010. 56 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba.
- MATHEW, A. P.; OKSMAN, K.; PIERRON, D.; HARMAD, M. F. **Crosslinked fibrous composites based on cellulose nanofibers and collagen with *in situ* pH induced fibrillation**. Cellulose, v. 19, n. 1, p. 139-150, 2012.
- MATSUURA, K.; KURATANI, T.; GONDO, T.; KAMIMURA, A.; INUI, M. **Promotion of skin epithelial cell migration and wound healing by a 2-benzazepine derivative**. European Journal of Pharmacology, v. 563, n. 1-3, p. 83-7, 2007.
- MAZUR, L. P. **Preparação e caracterização de nanocompósitos de poli(L-ácido láctico) e diferentes argilas organofílicas**. 2012. 133 f. Dissertação de mestrado - Universidade da Região de Joinville, Joinville, Santa Catarina.
- MIAO, C. W.; HAMAD, W. Y. **Cellulose reinforced polymer composites and nanocomposites: a critical review**. Cellulose, v. 20, n. 5, p. 2221-2262, 2013.
- MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. **Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing**. International Journal of Pharmaceutics, v. 463, n. 2, p. 127-36, 2014.
- MOHAMMADKAZEMI, F.; AZIN, M.; ASHORI, A. **Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media**. Carbohydrate Polymers, v. 117, p. 518-523, 2015.

- MONTANHA, V. C. **Preparação e caracterização de micropartículas de colágeno ou fibroína como suporte para células-tronco**. 2012. 88 f. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
- MORAES, P. R. F. S. **Estudo comparativo da membrana e do hidrogel de celulose bacteriana com colágeno em dorso de ratos**. 2013. 114 f. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
- MOURA, L. I.; DIAS, A. M.; CARVALHO, E.; DE SOUSA, H. C. **Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment-a review**. *Acta biomaterialia*, v. 9, n. 7, p. 7093-114, 2013.
- MUANGMAN, P.; OPASANON, S.; SUWANCHOT, S.; THANGTHED, O. **Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds**. *Journal of the American College of Clinical Wound Specialists*, v. 3, n. 1, p. 16-9, 2011.
- MULLER, F. A.; MULLER, L.; HOFMANN, I.; GREIL, P.; WENZEL, M. M.; STAUDENMAIER, R. **Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering**. *Biomaterials*, v. 27, n. 21, p. 3955-63, 2006.
- MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. **Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*)**. *Food Chemistry*, v. 85, n. 1, p. 81-89, 2004.
- NAGAI, T.; SUZUKI, N. **Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins**. *Food Chemistry*, v. 68, n. 3, p. 277-281, 2000.
- NEEL, E. A. A.; BOZEC, L.; KNOWLES, J. C.; SYED, O.; MUDERA, V.; DAY, R.; HYUN, J. K. **Collagen—emerging collagen based therapies hit the patient**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 4, p. 429-456, 2013.
- NELSON, D.; COX, M.. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Nova Iorque: Worth Publishers, p. 637-655. 2000.
- NOZAKI, A. C. M.; MARQUES, R. F. C.; MANZINE, L. M.; FERREIRA, M.; MARCHI, J. **Caracterização de intumescimento e degradação de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial**. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais: 10 p. 2012.
- OGAWA, M.; PORTIER, R. J.; MOODY, M. W.; BELL, J.; SCHEXNAYDER, M. A.; LOSSO, J. N. **Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*)**. *Food Chemistry*, v. 88, n. 4, p. 495-501, 2004.
- OKAMOTO, M.; JOHN, B. **Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds**. *Progress in Polymer Science*, v. 38, n. 10-11, p. 1487-1503, 2013.
- OLIVEIRA, C. R.; CARVALHO, J. L.; NOVIKOFF, S.; BERTI, F. V.; PORTO, L. M. **Bacterial cellulose membranes constitute biocompatible biomaterials for mesenchymal and induced pluripotent stem cell culture and tissue engineering**. *Journal of Tissue Science & Engineering*, v. 11, p. 2, 2012.
- OLIVEIRA, M. P. **Análise *in vitro* da citotoxicidade e proliferação celular em equivalentes de pele humana**. 2009. 71 f. Dissertação de Mestrado - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

- OLIVEIRA, S. H. S.; SOARES, M. J. G. O.; ROCHA, P. S. **Uso de cobertura com colágeno e *Aloe vera* no tratamento de ferida isquêmica: estudo de caso.** Revista da Escola de Enfermagem da USP, v. 44, n. 2, p. 346-351, 2010.
- OSMAN, S. A.; SOUZA, F. C.; DOLCI, J. E. **Estudo experimental sobre a aplicação de película de celulose (bionext®) em área cruenta de ressecção de concha nasal de coelhos.** Acta ORL - Técnicas em Otorrinolaringologia, v. 25, n. 4, p. 304-11, 2007.
- PATI, F.; ADHIKARI, B.; DHARA, S. **Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability.** Bioresource technology, v. 101, n. 10, p. 3737-42, 2010.
- PAUL, G. M. **Análise qualitativa do depósito de colágeno em sutura de bexiga de ratos tratados com a associação tacrolimus e micofenolato-mofetil.** 2011. 81 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná.
- PEDROSO, M. G. V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA.** 2009. 71 f. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
- PEI, Y.; YANG, J.; LIU, P.; XU, M.; ZHANG, X. Z.; ZHANG, L. N. **Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films.** Carbohydrate Polymers, v. 92, n. 2, p. 1752-1760, 2013.
- PENG, Y. Y.; GLATTAUER, V.; RAMSHAW, J. A.; WERKMEISTER, J. A. **Evaluation of the immunogenicity and cell compatibility of avian collagen for biomedical applications.** Journal of Biomedical Materials Researchpart A, v. 93, n. 4, p. 1235-44, 2010.
- PEREIRA, R. F.; BÁRTOLO, P. J. **Traditional therapies for skin wound healing.** Advances in Wound Care, 2014.
- PÉRTILE, R. A. N. **Estudo *in vitro* da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos.** 2007. 79 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.
- PÉRTILE, R. A. N.; ANDRADE, F. K.; ALVES, C.; GAMA, M. **Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells.** Carbohydrate Polymers, v. 82, n. 3, p. 692-698, 2010.
- PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. **Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives.** Applied Microbiology Biotechnology, v. 91, n. 5, p. 1277-86, 2011.
- PHAN, A. D.; NETZEL, G.; WANG, D.; FLANAGAN, B. M.; D'ARCY, B. R.; GIDLEY, M. J. **Binding of dietary polyphenols to cellulose: structural and nutritional aspects.** Food Chemistry, v. 171, p. 388-96, 2015.
- POWELL, H. M.; BOYCE, S. T. **EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability.** Biomaterials, v. 27, n. 34, p. 5821-7, 2006.
- QIAN, Z.; JUNG, W.; NGO, N. D.; LEE, S.; KIM, S. A. **Isolation and Characterization of Collagen from Skin of Bullfrog, *Rana catesbeiana* Shaw.** Fisheries and Aquatic Sciences, p. 239-243, 2007.

- QUEIROZ, P. V. S. **Desenvolvimento, caracterização e aplicação de membranas à base de celulose bacteriana e do nanocompósito celulose bacteriana/policaprolactona na ceratoplastia lamelar experimental em coelhos**. 2012. 83 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- RAVICHANDRAN, R.; VENUGOPAL, J. R.; SUNDARRAJAN, S.; MUKHERJEE, S.; SRIDHAR, R.; RAMAKRISHNA, S. **Composite poly-L-lactic acid/poly-(alpha,beta)-DL-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration**. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, v. 32, n. 6, p. 1443-51, 2012.
- RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos**. 2008. 145 f. Tese de Doutorado - Universidade Federal de Florianópolis, Florianópolis, Santa Catarina.
- RECOUVREUX, D. O. S.; RAMBO, C. R.; BERTI, F. V.; CARMINATTI, C. A.; ANTONIO, R. V.; PORTO, L. M. **Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration**. Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, v. 31, n. 2, p. 151-157, 2011.
- REIS, L. L. **Análise da colagenização de feridas cirúrgicas em pele de ratos submetidos à aplicação de óleo da semente de *Azadirachta indica***. 2008. 108 f. Dissertação de Mestrado - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, São Paulo.
- REZAZADE BAZAZ, M.; MASHREGHI, M.; MAHDAVI SHAHRI, N.; ASODEH, A.; BEHNAM RASSOULI, M.; GOLMOHAMMADZADEH, S. **Pharmaceutical application of frog skin on full-thickness skin wound healing in mice**. Pharmaceutical Biology, v. 51, n. 12, p. 1600-6, 2013.
- RODRIGUES, V.. **Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos**. 2009. 134 f. Dissertação de Mestrado - Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo.
- RUSZCZAK, Z. **Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs**. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 55, n. 12, p. 1679-1698, 2003.
- SACHLOS, E.; GOTORA, D.; CZERNUSZKA, J. A. N. T. **Collagen scaffolds reinforced with biomimetic composite nano-sized carbonate-substituted hydroxyapatite crystals and shaped by rapid prototyping to contain internal microchannels**. Tissue engineering, v. 12, n. 9, 2006.
- SAI, K. P.; BABU, M. **Studies on *Rana tigerina* skin collagen**. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 128, n. 1, p. 81-90, 2001.
- SAIBUATONG, O.; PHISALAPHONG, M. **Novo *Aloe vera*-bacterial cellulose composite film from biosynthesis**. Carbohydrate Polymers, v. 79, n. 2, p. 455-460, 2010.
- SALVI, D. T. B. **Membranas condutoras iônicas de celulose bacteriana**. 2010. 125 f. Dissertação de Mestrado -Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.
- SANTOS, M. H.; SILVA, R. M.; DUMONT, V. C.; NEVES, J. S.; MANSUR, H. S.; HENEINE, L. G. **Extraction and characterization of highly purified**

- collagen from bovine pericardium for potential bioengineering applications.** Materials Science Engineering C: Materials for Biological Applications, v. 33, n. 2, p. 790-800, 2013.
- SASKA, S.; TEIXEIRA, L. N.; DE OLIVEIRA, P. T.; GASPAR, A. M. M.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADDEQ, Y.; MARCHETTO, R. **Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering.** Journal of Materials Chemistry, v. 22, n. 41, p. 22102-22112, 2012.
- SHI, Z. J.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. **Utilization of bacterial cellulose in food.** Food hydrocolloids, v. 35, p. 539-545, 2014.
- SHODA, M.; SUGANO, Y. **Recent advances in bacterial cellulose production.** Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2005.
- SINGH, P.; BENJAKUL, S.; MAQSOOD, S.; KISHIMURA, H. **Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*).** Food Chemistry, v. 124, n. 1, p. 97-105, 2011.
- SIONKOWSKA, A. **Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review.** Progress in Polymer Science, v. 36, n. 9, p. 1254-1276, 2011.
- SIONKOWSKA, A.; SKOPINSKA-WISNIEWSKA, J.; WISNIEWSKI, M. **Collagen-synthetic polymer interactions in solution and in thin films.** Journal of Molecular Liquids, v. 145, n. 3, p. 135-138, 2009.
- SKIERKA, E.; SADOWSKA, M. **The influence of different acids and pepsin on the extractability of collagen from the skin of Baltic cod (*Gadus morhua*).** Food Chemistry, v. 105, n. 3, p. 1302-1306, 2007.
- SOUZA, I. C. L. **Desenvolvimento de membranas bioativas de colágeno quimicamente modificado contendo própolis vermelha para aplicação em cicatrização de feridas abertas.** 2013. 109 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Tiradentes, Aracaju, Sergipe.
- SOUZA, I. C. L.; NASCIMENTO, M. F.; NETA, R. G. S.; SANTOS, J. C.; COSTA, L. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. **Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract.** International Journal of Medicine and Medical Sciences, v. 5, n. 12, p. 514-524, 2013.
- STEELE, T. W. J.; HUANG, C. L.; NGUYEN, E.; SARIG, U.; KUMAR, S.; WIDJAJA, E.; LOO, J. S. C.; MACHLUF, M.; BOEY, F.; VUKADINOVIC, Z. **Collagen-cellulose composite thin films that mimic soft-tissue and allow stem-cell orientation.** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 24, n. 8, 2013.
- STUMPF, T. R. **Desenvolvimento de hidrogéis de celulose bacteriana para a cultura de células e permeação de biomoléculas.** 2012. 99 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.
- SUGANYA, S.; VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S.; LAKSHMI, B. S.; DEV, V. R. G. **Naturally derived biofunctional nanofibrous scaffold for skin tissue**

- regeneration.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 68, n. 0, p. 135-143, 2014.
- SUZUKI, C. L. S. **Avaliação *in vitro* da produção de colágeno tipo I por odontoblastos MDPC-23 e fibroblastos 3T3 após contato direto e indireto com bactérias relacionadas à cárie dental e infecções endodônticas.** 2013. 68 f. Dissertação de Mestrado -Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo.
- TAVARES, C. S.; HORA, E. C. **Caracterização das vítimas de queimaduras em seguimento ambulatorial.** Revista Brasileira de Queimaduras, v. 10, n. 4, p. 119-123, 2011.
- TOCHIO, T.; TANAKA, H.; NAKATA, S.; HOSOYA, H. **Fructose-1,6-bisphosphate aldolase A is involved in HaCaT cell migration by inducing lamellipodia formation.** Journal of Dermatological Science, v. 58, n. 2, p. 123-129, 2010.
- TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. **Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana.** Química Nova, v. 25, n. 6/A, p. 943-948, 2002.
- VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; AJITHKUMAR, T.; BALASUBRAMANIAN, T. **Isolation and characterization of drug delivering potential of type-I collagen from eel fish (*Evenchelys macrura*).** Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 23, n. 7, p. 1729-38, 2012.
- VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. **Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*).** Process Biochemistry, v. 48, n. 10, p. 1592-1602, 2013.
- VELLY, M. L. M. **A pele animal e os comportamentos mercadológicos para o novo milênio.** I Ciclo de Palestras sobre Ranicultura do Instituto de Pesca. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, v. 31, p. 49, 2001.
- VELMURUGAN, P.; RAO, J. R.; NAIR, B. U. **Biochemical and biophysical characterization of EDC treated rattus type I collagen.** Process Biochemistry, v. 48, n. 7, p. 1059-64, 2013.
- VULCANI, V. A. S. **Matrizes de colágeno para liberação controlada de progesterona.** 2004. 77 f. Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
- WAN, Y. Z.; HUANG, Y.; YUAN C., D.; RAMAN, S.; ZHU, Y.; JIANG, J. H.; HE, F.; GAO, C. **Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications.** Materials Science and Engineering: C, v. 27, n. 4, p. 855-64, 2007.
- WANG, J. P.; ZHU, Y. Z.; DU, J. **Bacterial cellulose: a natural nanomaterial for biomedical applications.** Journal of Mechanics in Medicine and Biology, v. 11, n. 2, p. 285-306, 2011.
- WANG, L. Z.; YANG, B.; DU, X. Q.; YANG, Y. F.; LIU, J. L. **Optimization of conditions for extraction of acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by response surface methodology.** Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 9, n. 4, p. 604-07, 2008.
- WANG, T. C.; LIN, S. C.; SHEN, Y. P.; LIU, S. Y.; WANG-MCCALL, T. L.; CHIN, M. H.; LIN, T. C.; YANG, C.; WU, W. H.; YANG, C. C. **Type I**

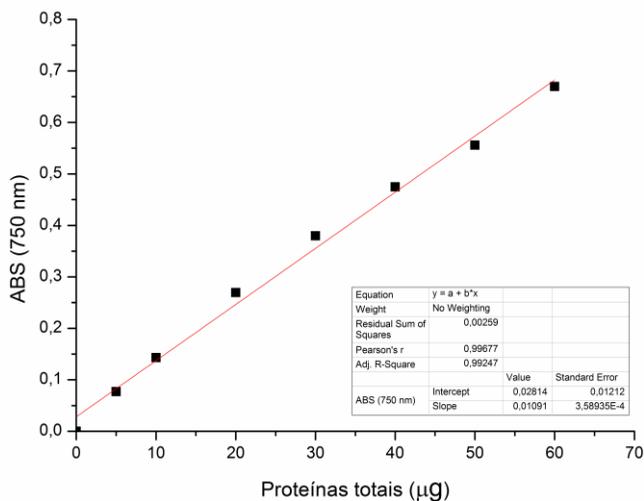
- collagen from bullfrog (*Rana catesbeiana*) fallopian tube.** African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 42, p. 8414-20, 2011.
- WANG, Z.; WANG, Y.; FARHANGFAR, F.; ZIMMER, M.; ZHANG, Y. **Enhanced keratinocyte proliferation and migration in co-culture with fibroblasts.** PLoS One, v. 7, n. 7, p. e40951, 2012.
- WEI, B.; YANG, G. A.; HONG, F. **Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties.** Carbohydrate Polymers, v. 84, n. 1, p. 533-38, 2011.
- WIEGAND, C.; ELSNER, P.; HIPLER, U. C.; KLEMM, D. **Protease and ROS activities influenced by a composite of bacterial cellulose and collagen type I *in vitro*.** Cellulose, v. 13, n. 6, p. 689-96, 2006.
- WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials.** Amsterdam; New York: Elsevier Scientific, 1987.
- WILLIAMS, D.F. **On the nature of biomaterials.** Biomaterials, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.
- WU, G. P.; WANG, X. M.; LIN, L. P.; CHEN, S. H.; WU, Q. Q. **Isolation and Characterization of pepsin-solubilized collagen from the skin of black carp (*Mylopharyngdon piceus*).** Advances in Bioscience and Biotechnology, v. 5, p. 642-650, 2014.
- WU, J.; ZHENG, Y.; SONG, W.; LUAN, J.; WEN, X.; WU, Z.; CHEN, X.; WANG, Q.; GUO, S. ***In situ* synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing.** Carbohydrate Polymers, v. 102, p. 762-71, 2014.
- XU, B. Y.; YANG, Z. Q.; XU, J. J.; XIA, X. H.; CHEN, H. Y. **Liquid-gas dual phase microfluidic system for biocompatible CaCO<sub>3</sub> hollow nanoparticles generation and simultaneous molecule doping.** Chemical communications (Cambridge, England), v. 48, n. 95, p. 11635-7, 2012.
- YAGUISHITA, N. **Avaliação da cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa depois da retirada total da pele em dorso de ratos.** Jornal Vascular Brasileiro, v. 6, n. 2, p. 193-194, 2006.
- YAN, M.; LI, B.; ZHAO, X.; QIN, S. **Effect of concentration, pH and ionic strength on the kinetic self-assembly of acid-soluble collagen from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin.** Food hydrocolloids, v. 29, n. 1, p. 199-204, 2012.
- YAN, M.; LI, B.; ZHAO, X.; REN, G.; ZHUANG, Y.; HOU, H.; ZHANG, X.; CHEN, L.; FAN, Y. **Characterization of acid-soluble collagen from the skin of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*).** Food Chemistry, v. 107, n. 4, p. 1581-86, 2008.
- YUE, P. Y.; LEUNG, E. P.; MAK, N. K.; WONG, R. N. **A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates.** Journal of Biomolecular Screening, v. 15, n. 4, p. 427-33, 2010.
- ZHANG, J.; DUAN, R.; HUANG, L.; SONG, Y.; REGENSTEIN, J. M. **Characterisation of acid-soluble and pepsin-solubilised collagen from jellyfish (*Cyanea nozakii Kishinouye*).** Food Chemicals, v. 150, p. 22-6, 2014.

ZHIJIANG, C.; GUANG, Y. **Bacterial cellulose collagen composite: characterization and first evaluation of cytocompatibility.** Journal of Applied Polymer Science, v. 120, n. 5, p. 2938-2944, 2011.



## APÊNDICE A – Curva-padrão de quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry.

Curva-padrão e equação da reta da quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry.





## APÊNDICE B – Curva-padrão de quantificação de colágeno por *Sirius red*.

Curva-padrão e equação da reta da quantificação de colágeno por *Sirius red*.

