



OS CURATIVOS DE NANOCELULOSE DE PINUS E NANOCELULOSE BACTERIANA SÃO SEMELHANTES NO TRATAMENTO DA QUEIMADURA DE SEGUNDO GRAU? ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Pine nanocellulose and bacterial nanocellulose dressings are similar in the treatment of second-degree burn? Experimental study in rats

Guilherme Andrade **COELHO**¹, Maria Angélica Baron **MAGALHÃES**¹, Alysson **MATIOSKI**¹, Jurandir Marcondes **RIBAS-FILHO**¹, Washington Luiz Esteves **MAGALHÃES**², Francine Ceccon **CLARO**², Rafael Koerich **RAMOS**¹, Thayline Mylena Santana de **CAMARGO**¹, Osvaldo **MALAFIA**¹

RESUMO - Racional: Apesar de todos os avanços da medicina e da grande variedade de curativos disponíveis, o tratamento das queimaduras ainda representa importante desafio médico. O curativo de membrana de celulose de pinus é biomaterial com características semelhantes à de celulose bacteriana, mas de menor custo. **Objetivo:** Avaliar a eficácia da membrana de nanocelulose de pinus na cicatrização de queimaduras profundas de segundo grau em ratos e comparar com a Membracel®. **Método:** Trinta ratos Wistar machos foram submetidos à queimadura profunda de segundo grau em dorso, com água fervente a 97°C por 20 s, gerando lesão de 314 mm². Os animais foram distribuídos em três grupos de curativos (n = 10): grupo 1 - gaze simples; grupo 2 - membrana de celulose bacteriana (Membracel®); e grupo 3 - membrana de celulose de pinus. Eles foram avaliados por 20 dias para verificar o quadro clínico, aspecto macro e microscópico e a contração da ferida. **Resultados:** Todos permaneceram clinicamente bem, sem diferenças de peso. Crostas foram observadas no grupo 1 e nenhuma nos grupos 2 e 3. Em relação à contração da cicatriz, os grupos 2 e 3 foram semelhantes, melhores que o grupo 1. A análise microscópica mostrou predomínio de grau de cicatrização avançado nos grupos 1 e 3, e inicial no grupo 2. O colágeno maduro foi predominante em todos os grupos. **Conclusão:** A membrana de nanocelulose de pinus é eficaz no tratamento de queimaduras experimentais de segundo grau em ratos e sua eficácia é semelhante à da membrana nanocelular bacteriana.

DESCRIPTORIOS: Cicatrização. Bandagem. Terapêutica. Nanotecnologia.



Crostas no 7º PO: G1 sim; G2 não; G3 não (esquerda para direita)

Mensagem central

O curativo com membrana de celulose vegetal de pinus é biomaterial com características semelhantes às da celulose bacteriana, porém com menor custo, e apresenta bons resultados no tratamento experimental de queimaduras.

Perspectiva

Apesar de todos os avanços da medicina e da grande variedade de curativos disponíveis, o tratamento de queimaduras ainda representa um importante desafio clínico e cirúrgico. A membrana de celulose do pinheiro foi eficaz no tratamento de queimaduras de segundo grau em ratos e sua eficácia funcional foi semelhante à da membrana celular bacteriana.

ABSTRACT - Background: Despite all the advances in medicine and the wide variety of dressings available, the treatment of burn wounds still represents an important medical challenge. The pinus cellulose membrane dressing is a biomaterial with characteristics similar to those of bacterial cellulose, but with lower cost. **Aim:** To evaluate the efficacy of pinus nanocellulose membrane on healing of deep second degree burns in rats and compare with Membracel®. **Method:** Thirty male Wistar rats were submitted to deep second degree burn in dorso, with boiling water at 97°C for 20 s, generating a 314 mm² area wound. The animals were distributed in three dressing groups (n=10): group 1 - simple gauze; group 2 - bacterial cellulose membrane (Membracel®); and group 3 - pinus cellulose membrane. They were evaluated for 20 days to verify clinical condition, macro and microscopic appearance and wound contraction. **Results:** All of them remained clinically well with no differences in weight. Crusts were observed in group 1, and none in groups 2 and 3. Regarding to scar contraction, groups 2 and 3 were similar, better than group 1. Microscopic analysis showed predominance of advanced healing degree in groups 1 and 3, and initial in group 2. Mature collagen was predominant in all groups. **Conclusion:** The pinus nanocellulose membrane is effective in the treatment of experimental second degree burn in rats and its effectiveness is similar to that of the bacterial nanocellular membrane.

HEADINGS - Wound healing. Bandages. Therapeutics. Nanotechnology.



www.facebook.com/abcdrevista



www.instagram.com/abcdrevista



www.twitter.com/abcdrevista

Trabalho realizado no ¹Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia, Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná - FEMPAR/Instituto de Pesquisas Médicas, Curitiba, PR, Brasil; ²EMBRAPA Florestas, Colombo, PR, Brasil

Como citar esse artigo: Coelho GA, Magalhães MAB, Matioski A, Ribas-Filho JM, Magalhães WLE, Claro FC, Ramos RK, de Camargo TMS, Malafía O. Os curativos de nanocelulose de pinus e nanocelulose bacteriana são semelhantes no tratamento da queimadura de segundo grau? Estudo experimental em ratos. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2020;33(2):e1533. DOI: /10.1590/0102-672020190001e1533

Correspondência:
Maria Angélica Baron
E-mail: mabmag@yahoo.com.br;
ipemppg@fempar.edu.br

Fonte de financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001
Conflito de interesse: não há
Recebido para publicação: 19/02/2020
Aceito para publicação: 25/05/2020

INTRODUÇÃO

Apesar do amplo número de técnicas e produtos disponíveis para o tratamento de feridas por queimaduras, os insucessos ainda são frequentes. Dentre os obstáculos a esse tratamento, destaca-se a dificuldade no fechamento da pele, devido à morte de células cicatriciais e ao risco de infecção, desidratação e outras comorbidades, além de prolongar o período de internamento e onerar o tratamento. Em função disso, existe ainda uma necessidade urgente de métodos eficazes e baratos para otimizar o processo cicatricial em pacientes queimados.

Existem, atualmente, inúmeros curativos disponíveis no mercado para o tratamento de queimaduras, mas nenhum deles atende a todas as propriedades de um curativo ideal¹⁵ e, apesar de todos os avanços, a utilização desses recursos não sempre é acompanhada de êxito. Somando-se a isso, o alto custo dos produtos disponíveis no mercado onera o tratamento, tornando-o muitas vezes impraticável. As nanofibras de celulose vêm ganhando especial atenção nos últimos anos devido a sua alta disponibilidade, biocompatibilidade e características físico químicas que lhe conferiram inúmeras possibilidades de aplicações biomédicas e farmacêuticas⁹.

Os curativos de nanocelulose bacteriana vêm sendo utilizados desde a década de 1980. Suas principais propriedades são controle da dor e inflamação, manutenção da umidade na ferida e de fatores de crescimento e defesa, favorecendo a granulação e reepitelização. Além disso, possibilita menor taxa de contaminação, visualização direta do aspecto e quantidade de secreção e trocas menos frequente de curativos²¹.

Uma das opções já consagradas no mercado é a Membracel® (Vuelo Pharma, Curitiba/PR, Brasil) uma membrana de celulose bacteriana capaz de substituir temporariamente a pele. É um curativo biocompatível, inerte e com alta resistência. Devido às suas características, permite a redução do tempo de cicatrização, não sendo necessária a troca diária do produto, o que facilita sua utilização e minimiza os custos do tratamento²⁴.

Os bons resultados obtidos com a utilização de celulose bacteriana estimularam o desenvolvimento desta pesquisa com nanofibras de celulose de pinus.

Diante das circunstâncias que envolvem o tratamento de feridas por queimaduras e dos eventuais insucessos com as técnicas já existentes, observou-se a necessidade de se criar um curativo simples, eficaz e acessível para o tratamento dessas lesões. Nesse contexto, a produção de uma membrana de celulose vegetal a partir do reaproveitamento de subprodutos da agroindústria, com características semelhantes às da celulose bacteriana, poderia agregar as vantagens da aplicação clínica da Membracel®, permitindo a redução de custos e favorecendo ainda a sustentabilidade, além de ampliar as opções terapêuticas para o tratamento de pacientes queimados.

Assim, os objetivos desta pesquisa foram verificar a segurança clínica e eficácia da membrana de celulose vegetal sobre a cicatrização de queimaduras de segundo grau profundo em pele de ratos e compará-las à segurança e eficácia da membrana de celulose bacteriana comercial (Membracel®).

MÉTODO

Este estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Cirurgia Experimental do Instituto de Pesquisas Médicas da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil. O trabalho foi conduzido de acordo com as normas técnicas de pesquisa e experimentação animal e com a Lei 11.794, de 8 outubro de 2008, sendo submetido à aprovação do comitê de ética para o uso de animais da FEMPAR.

Produção das nanofibras de celulose e as membranas

As nanofibras provenientes do pinus (*Pinus taeda*) foram produzidas no Laboratório de Tecnologia da Madeira da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Florestas), localizada em Colombo, PR, Brasil.

Para a produção dos filmes, primeiramente procedeu-se com o preparo do gel de celulose nanofibrilada, utilizando um moinho Super Masscolloider (Masuko Sangyo).

Resumidamente, 2% da polpa de celulose branqueada a seco em água pura é primeiro homogeneizada em um liquidificador de laboratório para obter uma pasta fofo. Esta suspensão, então, é passada 30 vezes pelo triturador coloidal de supermass, ajustando a distância entre os trituradores de carboneto de silício.

O gel de nanocelulose é filtrado a vácuo em um filtro de membrana de poliamida, a poliamida evita a adesão da membrana de celulose formada sendo facilmente removida após a secagem. Durante a secagem a 60°C, um vidro plano de 6 mm de espessura foi utilizado para prensar as membranas de celulose e mantê-las livres de rugas entre dois filtros de poliamida. A quantidade de gel de nanocelulose 2% foi calculada para resultar em uma membrana de nanocelulose com gramagem nominal de 30 gm⁻² (Figura 1). Antes de serem aplicadas sobre as feridas dos animais, as membranas de celulose foram previamente esterilizadas em óxido de etileno.



FIGURA 1 – Etapas da produção das nanofibras de celulose vegetal: A) moinho Mass Colloider Masuko; B) suspensão de celulose sendo processada pelo moinho; C) utensílios típicos usados para produção de suspensão de celulose nanofibrilada; D) filtração a vácuo para produção de filmes; E) membrana produzida

Distribuição dos grupos

Foram estudados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adultos, brancos. No início da pesquisa, todos os animais apresentavam quatro meses de vida e peso médio de 150 g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=10). Os procedimentos realizados foram: 1) grupo 1 (controle) - queimadura de segundo grau profundo na pele do dorso dos animais por lesão térmica, com dimensão de 2 cm de diâmetro e cicatrização por segunda intenção; 2) grupo 2 - queimadura de segundo grau profundo na pele do dorso dos animais por lesão térmica, com dimensão de 2 cm de diâmetro e aplicação de membrana de celulose bacteriana (BNM/Membracel®) cobrindo toda a extensão da ferida; grupo 3 - queimadura de segundo grau profundo na pele do dorso dos animais por lesão térmica, com dimensão de 2 cm de diâmetro e aplicação de membrana de celulose vegetal derivada de pinus (PNM), cobrindo toda a extensão da ferida.

Procedimento anestésico

Todos os animais foram submetidos a anestesia geral mediante injeção intramuscular de cloridrato de xilazina a 2% (Xilazin®, Syntec do Brasil, Cotia, SP, Brasil) na dose de 10 mg/kg, associado a cloridrato de quetamina a 10% (Cetamin®, Syntec do Brasil, Cotia, SP, Brasil), na dose de 60 mg/kg. Para analgesia prévia, foi aplicada uma dose de morfina (Morfina®, União Química Farmacêutica, São Paulo), na dose de 0,5 mg/kg, 10 min antes do procedimento.

Indução das queimaduras

Foi induzida queimadura térmica de segundo grau profundo na pele do dorso, com diâmetro de 20 mm e área de 314 mm². A medida da área das lesões foi obtida a partir da fórmula para área circular em que: área do círculo = $\pi \times \text{raio}^2$, sendo $\pi = 3,14$ e raio da ferida = 1 cm (10 mm).

A ferida foi a mesma em todos os ratos, seguindo como modelo um molde feito com seringa de 20 ml, que teve sua extremidade distal cortada na transversal para gerar um orifício circular, de modo a dimensionar a área a ser lesionada. O dispositivo era pressionado sobre o dorso do animal, sendo então preenchido com 10 ml de água em ebulição (a 97°C), com auxílio de outra seringa (Figura 2A1). Esperava-se o tempo de 20 s, marcados através de cronômetro, e posteriormente, retirava-se o dispositivo, cuidando para que a água não caísse no corpo do rato e secando imediatamente o resíduo de água que pudesse entrar em contato com o animal (Figura 2A2). A temperatura da água foi monitorada com termômetro.

Imediatamente após a realização da queimadura, foi coletado um pequeno segmento de pele (cerca de 1 mm²), incluindo tecido subcutâneo, para confirmar a profundidade da lesão. Esses fragmentos foram preparados para análise histológica e corados com H&E. Em seguida, as lesões foram deixadas abertas nos animais dos três grupos, para visualizar a evolução e formação de crosta.

Durante os três primeiros dias após indução das lesões, formou-se uma crosta sobre a ferida de cada animal (Figura 2A3). No terceiro dia após o procedimento, essa crosta foi retirada por desbridamento, gerando uma lesão aberta. A partir daí, procedeu-se com a colocação das membranas nos animais dos grupos 2 e 3, e apenas curativo de gaze no grupo 1.

No grupo 1, as feridas foram cobertas com gaze levemente

embebida em solução salina 0,9% e cobertas com fita crepe (Figura 2B6). No grupo 2 foram aplicadas as membranas Membrace!® (Figura 2B4) deixando cerca de 0,5 cm de sobra em relação ao tamanho da ferida. No grupo 3 foram aplicadas membrana de celulose vegetal (Figura 2B5) sobre as feridas, deixando cerca de 0,5 cm de sobra em relação ao tamanho da ferida. Em seguida foram colocadas compressas de gazes seca sobre as membranas e cobertas com fita crepe. As membranas aplicadas nos animais dos grupos 2 e 3 eram substituídas a cada sete dias ou sempre que os animais conseguissem retirá-las, procedendo-se à realização dos mesmos procedimentos já descritos.

Após os procedimentos, foi realizada antibioticoprofilaxia, mediante injeção subcutânea de amoxicilina na dose de 20 mg/kg, a cada 24 h, durante cinco dias. A analgesia foi realizada por meio de administração de cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg, a cada 12 h, durante cinco dias.

Os animais foram acompanhados diariamente durante 20 dias para verificação de parâmetros clínicos sistêmicos e aspectos locais da ferida. Para avaliação clínica dos animais, foram observados parâmetros como estado geral (movimentação, estado de alerta e responsividade ao ambiente), apetite, mortalidade e variação ponderal durante o período de acompanhamento.

Com vista a detectar sinais de reação alérgica, inflamação, infecção ou outras complicações locais, as feridas eram avaliadas sempre que os animais retiravam os curativos e eles eram refeitos. Os aspectos macroscópicos avaliados foram formação de exsudato, sangramento, sinais flogísticos (rubor, calor, dor e edema), presença de abscessos e tecido necrótico (crostas). Também foi verificado se a retirada das membranas e dos curativos causou danos às feridas, desconforto ou dor aos ratos.

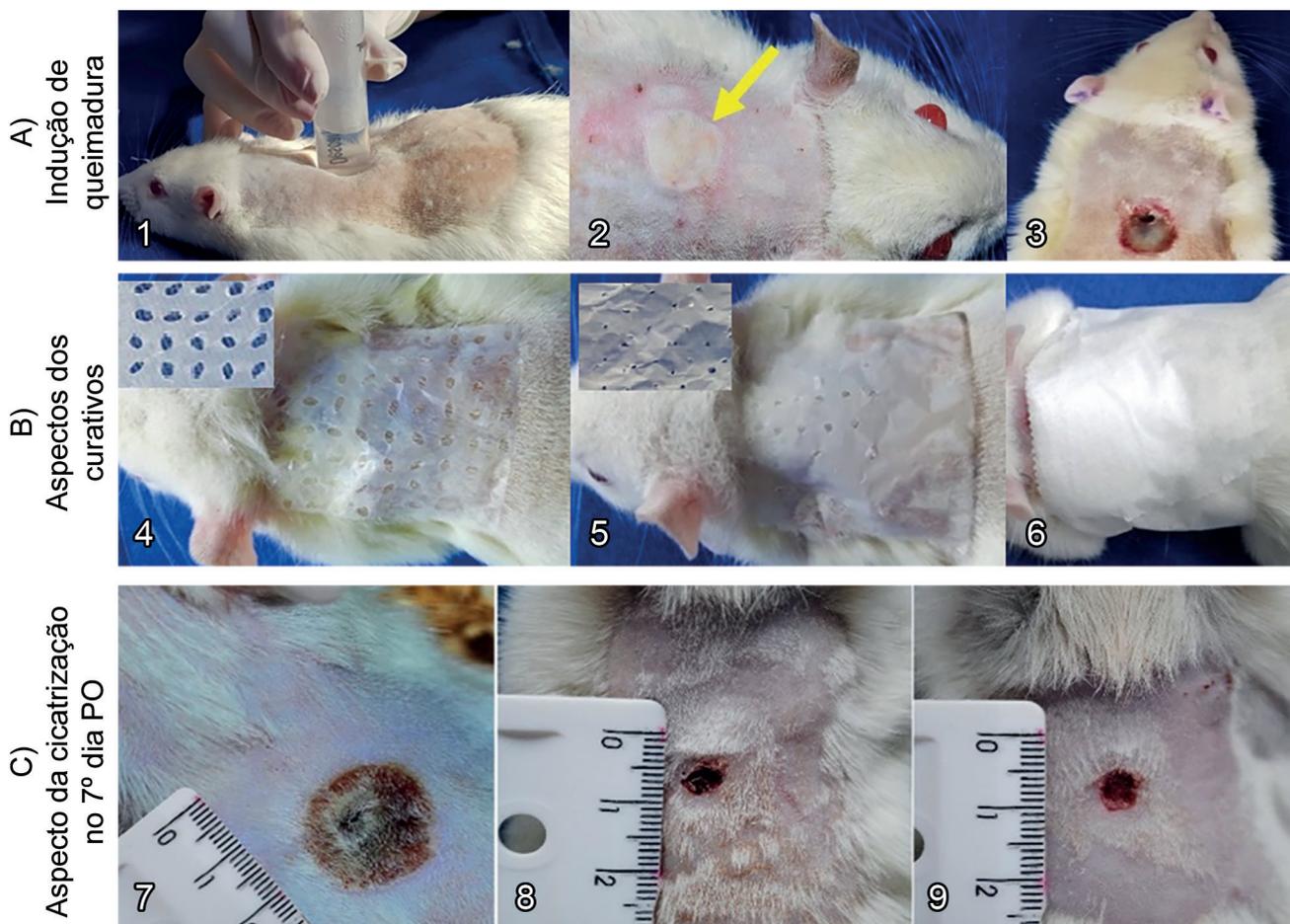


FIGURA 2 - A) *Indução da queimadura*: 1) água fervente em seringa de 20 ml; 2) aspecto final da queimadura - observar a área pálida da pele circundada por um halo hiperêmico (seta); 3) aspecto da ferida três dias após a indução da queimadura - observar a formação de crosta. B) *Aparências finais do curativo*: 4) curativo grupo 2 confeccionado com BNM (Membrace!®); 5) curativo grupo 3 confeccionado com PNM; 6) ataduras simples de gaze e crepe. C) *Aspecto macroscópico no 7º dia de seguimento*: 7) grupo 1, totalmente coberto por crostas; 8) ferida avermelhada sem crostas no grupo 2; 9) o mesmo, em um rato do grupo 3.

Seguimento

Ao final do período de acompanhamento, os animais foram novamente pesados e submetidos à eutanásia por overdose anestésica com cloridrato de cetamenina (200 mg/kg). Em seguida, dois pequenos fragmentos de pele transversais à cicatriz, na borda da lesão, foram retirados para análise histológica

No último dia do experimento, foi realizada mensuração da área da lesão e coleta de fragmentos para estudo histológico. Essa mensuração foi feita com auxílio de um paquímetro digital DC-60®, por meio do qual foram obtidas as medidas horizontal e vertical de cada ferida. A medida de todas as feridas foi realizada sempre pelo pesquisador. Além dele, outra medida foi realizada por outro pesquisador, sem conhecimento sobre o grupo avaliado. A partir da área foi calculada a porcentagem de contração da ferida como proposto por Agren, Mertz e Franzén (1997)¹, em que a porcentagem de contração (PC) consiste no resultado da área final (AF) menos a área inicial (AI), dividido pela área inicial e multiplicado por 100.

$$PC (\%) = [FA - IA (\text{mm}^2) / IA (\text{mm}^2)] \times 100$$

Análise microscópica

Os cortes de tecido preparados para histologia foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) e picosirius red (PR). Os cortes H&E foram examinados no software de microscópio óptico Axiovision (Carl Zeiss®), e suas imagens digitais com o Axiovision (Carl Zeiss®). As seções coradas com PR foram lidas em microscópio óptico com luz polarizada para determinar a concentração de fibras de colágeno tipo I e tipo III. As imagens digitais foram analisadas com o programa Image-Pro Plus 4.5®, que reconhece fibras grossas e vermelhas (colágeno tipo I maduro) e fibras de colágeno verdes e finas (tipo III imaturo).

O estudo microscópico consistiu na verificação do escore de cicatrização (1, 2, 3 e 4) e da porcentagem de colágeno tipo I e tipo III.

A pontuação de cicatrização baseou-se no grau de invasão celular, formação de tecido de granulação, fibroblastos, vascularização e reepitelização⁸. O escore 1 consistiu em feridas com acúmulo mínimo de células, falta de tecido de granulação ou epitelização. Os cortes classificados como escore 2 apresentavam tecido de granulação fino e imaturo preenchido por células inflamatórias, mas com poucos fibroblastos, capilares ou deposição de colágeno e mínima migração epitelial. O escore 3 incluiu feridas com tecido de granulação moderadamente espesso, preenchido predominantemente por fibroblastos e extensa neovascularização. A deposição de colágeno foi moderada e o epitélio pode variar de migração mínima a moderada. O escore 4 consistiu em tecido de granulação abundante e neovascularização, preenchido por fibroblastos e extensa deposição de colágeno; as feridas foram cobertas por epitelização parcial a completa, com ou sem crostas.

Análise estatística

Os resultados de variáveis quantitativas foram descritos por média±desvio padrão da média. Variáveis categóricas foram descritas por frequência e percentual. Para a comparação das variáveis quantitativas entre os grupos, foi usado o modelo Kolmogorov-Smirnov test seguida de análise da variância (ANOVA) com um fator e o teste LSD (least significant difference) para comparações múltiplas post-hoc. Para a análise do peso final e da variação ponderal, foi usado o modelo de análise de covariância (ANCOVA) ajustando-se para o peso inicial. Variáveis categóricas foram analisadas considerando-se o teste de Qui-quadrado e o ajuste de modelos de regressão logística. Foram considerados significativos os valores de p<0,05.

RESULTADOS

Avaliação clínica

A indução anestésica, assim como a realização das queimaduras, evoluiu sem maiores complicações. Todos os animais permaneceram

bem, puderam beber água e comer alimentos sem dificuldade durante todo o experimento.

A substituição dos curativos não causou danos às feridas regeneradas nem dor aos animais, pois as membranas podiam ser facilmente destacadas da superfície da ferida. Substituir os curativos, no entanto, resultou em pequenos danos e sangramento nas feridas e desconforto para os ratos.

Varição ponderal

Não houve diferença entre os grupos em relação à variação ponderal ocorrida entre o início do estudo e o dia da eutanásia (p=0,410, Tabela 1).

TABELA 1 – Valores (média±desvio-padrão da média) de peso (em gramas) obtidos nos animais dos grupos 1, 2 e 3, antes da queimadura (dia 0) e após o término do acompanhamento (dia 20), além da variação ponderal ocorrida.

Grupo	Peso (em gramas)		
	Dia 0	Dia 20	Varição Ponderal
1	129,0 ± 12,6	197,3 ± 25,2	68,3 ± 18,8
2	143,2 ± 8,4	203,5 ± 9,6	60,3 ± 9,0
3	131,0 ± 14,5	196,7 ± 20,3	65,7 ± 13,3

1=grupo controle; 2=grupo; 3=grupo 3; dia 0=antes da indução da queimadura; dia 20=último dia do experimento

Avaliação macroscópica das feridas

Não ocorreu nenhum caso de exsudato, sangramento, inflamação local ou abscessos nas feridas dos animais dos grupos 2 e 3. Houve formação de crostas mesmo após o desbridamento em todos os animais do grupo 1 (Figura 2C7). Nos animais dos grupos 2 e 3, a ferida manteve-se de coloração avermelhada, coberta por uma fina camada de tecido epitelial neoformado (Figuras 2C8 e 2C9).

Contração cicatricial

Ao comparar a área final, contração absoluta da cicatriz e percentual de contração da cicatriz, foi encontrada diferença entre os grupos (p<0,001). Comparando os valores entre os grupos, foi encontrada diferença entre os grupos 1 e 2 (p<0,001), bem como entre os grupos 1 e 3 (p<0,001), porém não houve diferença entre os grupos 2 e 3 (p=0,348), o que significa que a contração da cicatriz nos grupos 2 e 3 foi semelhante e maior do que no grupo 1 (Tabela 2).

TABELA 2 – Valores (média±desvio padrão da média) de área final da ferida (FA, mm²), contração cicatricial absoluta (mm²) e porcentagem de contração cicatricial dos animais dos grupos 1, 2 e 3.

Grupo	Área de cicatriz final (mm²)	Contração cicatricial absoluta (AF - AI) (mm²)	Contração (% da área inicial)
1	91,4 ± 38,3	222,6 ± 38,3	70,9 ± 17,0
2	38,3 ± 25,3	275,7 ± 25,3	87,8 ± 11,2
3	27,2 ± 15,3	286,8 ± 15,3	91,3 ± 6,8

Grupos - 1=grupo controle 2=grupo com queimadura de segundo grau profundo e tratamento com Membracel®; 3=grupo com queimadura de segundo grau profundo e tratamento com membrana de celulose vegetal; AF=área final; AI=área inicial

Análise microscópica

Profundidade da queimadura

Em todos os animais, a queimadura atingiu totalmente a derme, preservando o tecido subcutâneo adjacente, consistindo em queimadura profunda de segundo grau (Figura 3A).

Grau de cicatrização

Nos animais dos grupos 1 e 3, houve predominância de feridas em grau avançado de cicatrização. Nesses grupos, a ferida apresentava-se parcialmente ou totalmente epitelizada, preenchida por tecido de granulação espesso e neovascularização abundante (Figuras 3B e 3D). Já nos animais do grupo 2, predominaram feridas

em estágios iniciais de cicatrização, preenchidas por tecido de granulação delgado e imaturo, células inflamatórias, capilares e alguns fibroblastos (Figura 3C).

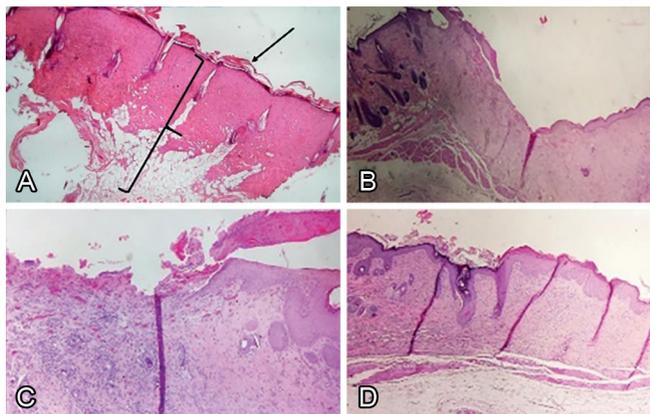


FIGURA 3 - A) Aspecto microscópico da ferida imediatamente após a queimadura, evidenciando lesão completa da derme e epiderme (observar a preservação da lâmina basal - seta -, bem como músculo e tecido adiposo - braquete); B) aspecto microscópico evidenciando estágio de cicatrização no último dia de acompanhamento, grupo 1, com tecido de granulação de espessura média, estágio 3; C) grupo 2, preenchido por tecido de granulação imaturo, células inflamatórias, capilares e alguns fibroblastos, com ausência de epitélio na maior parte da ferida, estágio 2; D) grupo 3, com tecido de granulação espesso e vascularizado, recoberto por epitélio, estágio 4 (H&E x40)

Comparando a frequência dos escores de cicatrização, foi encontrada diferença entre os grupos ($p=0,034$). Os valores foram diferentes entre os grupos 1 e 2 ($p=0,025$). No entanto, foram semelhantes entre os grupos 1 e 3 ($p=0,284$) e entre os grupos 2 e 3 ($p=0,131$, Tabela 3).

TABELA 3 – Frequência absoluta e relativa dos graus de cicatrização encontrados nos animais dos grupos 1, 2 e 3, no último dia de seguimento.

Grupo	Graus de cicatrização			
	1	2	3	4
1	0 (0%)	1 (10%)	3 (30%)	6 (60%)
2	0 (0%)	7 (70%)	3 (30%)	1 (10%)
3	0 (0%)	3 (30%)	3 (30%)	4 (40%)

Grupos: 1=grupo controle 2=grupo com queimadura de segundo grau profundo e tratamento com Membracel®; 3=grupo com queimadura de segundo grau profundo e tratamento com membrana de celulose vegetal; graus - 1=ausência de tecido de granulação; 2=tecido de granulação escasso e imaturo epitelização mínima; 3=tecido de granulação médio, neovascularização epitelização moderada; 4=tecido de granulação abundante e vascularizado epitelização abundante.

Porcentagem de colágeno tipo I e tipo III

A porcentagem de colágeno tipo I e tipo III foi semelhante entre os grupos ($p=0,449$, Tabela 4). Havia colagenização moderada a abundante, predominantemente de colágeno maduro, caracterizada por fibras espessas coradas de vermelho.

TABELA 4 – Porcentagem de colágeno tipo I e III nas feridas dos animais dos grupos 1, 2 e 3, ao término do período de acompanhamento

Grupo	Colágeno I (%)	Colágeno III (%)
1	80,9±20,7	19,1±20,7
2	78,1±16,0	21,9±16,0
3	72,8±17,9	27,2±17,9

Grupos - 1=grupo controle 2=grupo com queimadura de segundo grau profundo e tratamento com Membracel®; 3=grupo com queimadura de segundo grau profundo e tratamento com membrana de celulose vegetal

Observou-se menor proporção de colágenos jovens nos três grupos. caracterizado por fibras finas coradas de verde (Figura 4). O colágeno estava desorganizado e cheio de lacunas no grupo 1 (Figura 4A) mas organizados em grupos 2 e 3 (Figuras 4B e 4C).

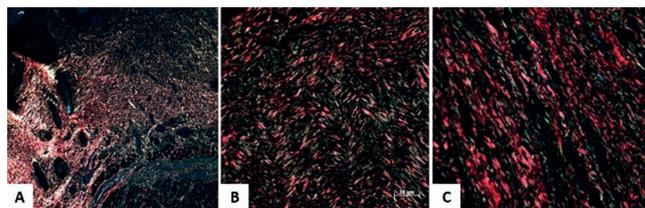


FIGURA 4 - Fotomicrografia das fibras colágenas dos animais dos grupos 1, 2 e 3: A) predominância das fibras colágenas maduras, mas desorganizadas e cheio de lacunas no grupo 1; B) fibras de colágeno maduras, espessas e organizadas no grupo 2; C) e também no grupo 3 (PR)

DISCUSSÃO

Apesar dos avanços médicos e da bioengenharia, o tratamento de queimaduras ainda representa um desafio clínico e cirúrgico, especialmente quando eles complicam. Existe um grande número de produtos disponíveis, no entanto, seus resultados permanecem duvidosos.

Os polímeros à base de celulose são produtos muito abundantes e disponíveis com alto potencial para aplicações biomédicas e biotecnológicas. As nanofibras de celulose apresentam diversas vantagens para serem utilizadas no tratamento de feridas, como biocompatibilidade, manutenção da umidade, resistência e baixa toxicidade^{6,13,14,17,20,22,23,25}. Além disso, o crescimento bacteriano¹⁷ e viral²⁶ poderia ser reduzido na presença da nanocelulose. Essas propriedades agregam excelentes características ao curativo de nanocelulose⁹.

Membranas de nanocelulose bacteriana (BNM) têm sido utilizadas com sucesso no tratamento de queimaduras e outras feridas. Estudos mostram melhora no processo de cicatrização e redução do tempo de cicatrização com esses curativos^{3,12,19,21,24}. Membracel® é um curativo à base de nanocelulose bacteriana muito utilizado no tratamento de queimaduras, que pode atuar como um substituto temporário da pele. É biocompatível, inerte, atóxico, e tem boa resistência em ambiente úmido. A presença de poros permite a troca gasosa e a passagem do exsudato para um curativo secundário. Pelas suas características, as trocas diárias não são necessárias, evitando danos ao leito da ferida e favorecendo o tecido cicatricial. Essas propriedades fornecem características do Membracel® próximas ao curativo ideal²⁴. Contudo, seu custo relativamente alto limita o uso em larga escala pelo sistema de saúde.

Pelos bons resultados obtidos com o BNM na rotina clínica, nosso objetivo foi investigar o efeito do PNM no tratamento de queimaduras. A celulose vegetal é química e fisicamente semelhante à celulose bacteriana, mas com menor custo de produção o que estimulou o desenvolvimento desta pesquisa para avaliar seus efeitos no processo de cicatrização.

A presente pesquisa é uma das primeiras a avaliar o efeito das nanofibras de celulose vegetal no processo de cicatrização de tecidos e é a primeira na literatura a relatar seu uso no tratamento de queimaduras.

Escolhemos a queimadura profunda de segundo grau por ser a profundidade mais frequente em pacientes queimados². Além disso queimaduras mais superficiais cicatrizam espontaneamente enquanto as mais profundas geralmente requerem enxerto de pele, que não é o objetivo desta pesquisa. No presente estudo todas as lesões atingiram totalmente a derme, confirmando a eficácia e efetividade do modelo aqui proposto para produzir

queimadura de segundo grau profunda. Esses dados são relevantes para padronizar as lesões de queimadura e, conseqüentemente os resultados do estudo, o que é de grande importância para o estudo de queimaduras.

A avaliação do comportamento, ganho de peso, e a recuperação precoce em animais permite observar a resposta sistêmica devido à lesão tecidual. A presença de dor e agitação nos animais do grupo 1, e ausência nos grupos 2 e 3, mostram a eficiência da membrana em minimizar o desconforto. O alívio adequado da dor tem efeito positivo na velocidade e na qualidade da recuperação do dano ao tecido⁹, o que corrobora os resultados do presente estudo.

Os parâmetros macroscópicos aqui estudados permitiram verificar a evolução das feridas, sinais de inflamação e infecção, bem como a velocidade de cura. Não observamos nenhum caso de necrose, intensa reação inflamatória, exsudato purulento, ou abscessos em ambos os grupos tratados com curativos de celulose, semelhante a estudos anteriores usando nanocelulose bacteriana^{5,9,24}. Esses dados sugerem que PNM, bem como BNM, permite a drenagem da ferida, sem favorecer o ressecamento da área coberta e a contaminação bacteriana, dois dos principais fatores que comprometem a cura. No presente estudo, não observamos reações de sensibilidade à membrana vegetal, como edema, rubor, dor, ou coceira, confirmando a segurança clínica para seu uso em feridas. Outros estudos anteriores também confirmaram a biocompatibilidade de curativos à base de nanocelulose, sem sinais de reações alérgicas e inflamatórias decorrentes do seu uso^{5,9}. Esses dados confirmaram resultados positivos quanto à biocompatibilidade e segurança clínica e poderiam garantir a ausência de qualquer efeito tóxico desencadeado pelo PNM, bem como outros curativos à base de nanocelulose testados antes^{13,17,21,24}.

Para medir a área da ferida e a contração da cicatriz, usou-se paquímetro, como Yaguishita (2007)²⁴ e Agren et al. (1997)¹, que permite verificar a relação de contração da cicatriz, que foi maior nos animais dos grupos 2 e 3, corroborando com outros estudos^{14,16,24}. Embora não tenha havido diferença significativa no fechamento da ferida entre os dois grupos, a contração média da cicatriz e a área final no grupo 3 foram maiores do que no grupo 2. Esses resultados sugerem que o PNM foi mais eficiente na contração da ferida do que os outros curativos testados.

Não temos subsídios para dizer que o PNM tem propriedades de reparo de tecidos, de outra forma, pode servir de matriz para células e proteínas, que participam naturalmente do processo de cura. A membrana à base de nanocelulose pode favorecer a proliferação, migração celular e epitelização das bordas para o centro das lesões, melhorando a cicatrização de feridas^{7,10,13,14}.

Em ambos os grupos de curativos de celulose não houve contaminação do local da ferida e a umidade foi mantida provavelmente pela cobertura da ferida com curativo poroso. A drenagem das secreções pelos poros impede o crescimento bacteriano e mantém o ambiente úmido. Esse fator resulta em melhora de 35-45% na taxa de epitelização das feridas⁹. A contaminação da ferida é um dos fatores mais prejudiciais à cicatrização devido à liberação de enzimas citotóxicas pelas bactérias e pelo próprio processo de exsudação, que cria barreira mecânica à ação das células de defesa e cicatrização. No presente estudo não temos subsídios para afirmar que o BNM evitou o crescimento bacteriano, uma vez que não foi realizada cultura de células. Contudo, a avaliação clínica e macroscópica sugere que não foi apoiado o crescimento de patógenos. Curativos à base de nanocelulose têm o potencial de impedir o crescimento do biofilme bacteriano. Essas membranas testadas podem cobrir as feridas, protegendo-o contra microrganismos externos⁹.

Membracel® possui poros criados com memória de posição, o que significa que eles não mudam de diâmetro com o tempo e permite a troca contínua de fluidos²⁴. Como resultado, no PNM testado, realizamos os poros manualmente para permitir a drenagem das secreções. Por se tratar de um novo produto, em fase inicial de testes e ainda não comercializado, não há padronização do tamanho e formato dos poros. Com a conclusão

desta pesquisa faremos novos estudos para desenvolver um curativo padronizado em espessura, tamanho e forma porosa, para iniciar os testes clínicos.

Características importantes de um curativo são a capacidade de absorver fluidos e exsudatos, bem como fácil remoção da ferida, sem causar dor ou lesão ao tecido em cicatrização^{9,13}. Neste estudo, a substituição dos curativos (BNM e PNM) não causou danos às feridas regeneradas, pois as membranas podem ser facilmente destacadas do leito da ferida, conforme observado por Hakkarainen et al. (2016)⁹. Tirando as gazes, contudo, resultou em ligeiros danos às feridas o que prolongou a recuperação. O curativo de gaze tem grande permeabilidade mas forte aderência à ferida causando dor e lesão do tecido quando removido¹⁸. Além disso, suporta a secura da ferida prejudicando a migração celular e, conseqüência, o processo de cura.

Em todos os ratos do grupo 1 estavam presentes crostas e cada retirada e limpeza causava traumas, sangramento, e reação dolorosa. Além disso, a presença de tecido necrótico predispõe ao crescimento bacteriano e prejudica a ação do fibroblasto¹¹. O curativo de nanocelulose promove o desbridamento autolítico, reduz a dor, e acelera a granulação, que são características cruciais para a cicatrização de feridas⁹.

No dia 20, uma camada superficial de neopitélio cobria a superfície da ferida e neovascularização foi observada nos locais das feridas no grupo 3. Também observamos estágio avançado de cicatrização no grupo 1, mas a epitelização ainda era escassa. Contudo, a maioria das feridas do grupo 2 estava em estágios iniciais de cicatrização, ao contrário de Yaguishita (2007)²⁴ e Lin et al (2013)¹³. Estes autores encontraram estágio avançado de cicatrização em feridas tratadas com BNM no 20º dia. Esses dados divergentes podem ser explicados pelos diferentes tipos de feridas desenvolvidas enquanto estudavam lesões agudas e realizavam feridas de queimadura. A necrose tecidual resultante da escaldadura pode ter comprometido a cicatrização o que pode explicar a divergência entre as pesquisas. Os resultados da presente pesquisa sugerem que o PNM apóia o processo de cicatrização de queimaduras melhor do que os outros produtos testados.

A coloração PR nos permite verificar a extensão e a concentração de colágeno bem como para diferenciar fibras maduras e imaturas. A derme saudável possui 80% de colágeno tipo I e 20% de colágeno tipo II, enquanto que o tecido de granulação apresenta 30-40% do tipo III¹¹. Em nossa pesquisa, a porcentagem de colágeno foi semelhante entre os grupos, ao contrário de Yaguishita (2007)²⁴ que encontraram maior proporção de colágeno maduro em animais tratados com Membracel®. Provavelmente ocorreu devido ao local onde retiramos os cortes de pele para análise. Yaguishita²⁴ removeu toda a ferida para estudo histológico, sendo capaz de estabelecer avaliação mais confiável quanto à proporção de colágeno e as diferenças entre os grupos.

No presente estudo, retiramos as seções de pele apenas na borda da ferida, onde o processo de cura começa. Portanto, tende a ser semelhante entre os grupos no período analisado. O mecanismo de contração é o movimento centrípeto das margens da ferida até o centro da lesão. Desempenha papel fundamental na redução da área da ferida e cura por segunda intenção, como em nosso experimento. A reepitelização ocorre pela migração de células epiteliais de anexos e estruturas preservadas da derme. A migração e a proliferação começam durante a fase proliferativa e ocorrem até o fechamento completo da ferida e a barreira da membrana restabelecida¹¹.

Outra diferença entre nossa pesquisa e o trabalho de Yaguishita²⁴ foi o período de acompanhamento. Estes autores observaram os animais semanalmente por 28 dias, enquanto fizemos apenas uma análise microscópica no 20º dia de acompanhamento. Contudo, o tempo não parece ter importância para os diferentes resultados, mas sim o local da pele removida. Yaguishita não observou diferença na porcentagem de colágeno após 14 dias. Seus dados, adicionado aos nossos resultados, eram consistentes com os de estudos anteriores, que diziam que as feridas apresentam 80% de colágeno maduro (tipo I) no 20º dia¹¹.

Nossos achados microscópicos (H&E e PR) mostraram que o processo de cicatrização inicial, que começa nas margens da ferida, é semelhante entre os três grupos. Contudo, o exame macroscópico mostrou que as feridas tratadas com PNM e BNM cicatrizaram mais rapidamente, em comparação com aqueles tratados com curativos de gaze simples. Esses resultados foram consistentes com os de vários estudos anteriores, mostrando que curativos à base de nanocelulose auxiliam no processo de cicatrização^{4,7,9,10,13,14}.

A contração da cicatriz dos animais tratados com PNM, bem como os outros achados macroscópicos, não diferiu daqueles tratados com BNM. Esses dados confirmam a eficácia do produto recém-testado para o tratamento de queimaduras de segundo grau. O tempo de cura mais curto, adicionado à menor chance de crescimento bacteriano, minimiza o tempo de internação hospitalar, bem como a necessidade de medicamentos tópicos e sistêmicos, consequentemente reduzindo custos e complicações clínicas. Considerando o grande número de pacientes queimados atendidos diariamente em todo o mundo é de grande importância criar um curativo efetivo menos caro e acessível.

Nesta pesquisa não avaliamos os custos do tratamento com PNM, mas estudos preliminares sugerem que é significativamente mais barato do que outros produtos disponíveis amplamente comercializados.

O principal benefício das nanoceluloses de madeira é sua produtividade a partir da fonte inesgotável de celulose das plantas, adicionado ao seu menor custo de produção. Portanto, poderia ser possível criar um produto mais barato e acessível para todas as classes. Além disso, o menor tempo de cicatrização e a baixa probabilidade de infecção representam vantagens importantes do uso do PNM no tratamento de queimaduras.

Estamos dando continuidade aos estudos planejados sobre o uso do PNM no tratamento de queimaduras estudando seu efeito no crescimento bacteriano e lesões mais profundas, como também seus custos de produção. Nosso objetivo é padronizar o curativo PNM e estendê-lo para ensaios clínicos. Não temos a intenção de substituir os produtos disponíveis no mercado, mas sim para incluir PNM como um recurso acessível para o tratamento de queimaduras.

CONCLUSÃO

O curativo de membrana de nanocelulose de pinus é seguro e eficaz para o tratamento de queimaduras profundas de segundo grau em ratos. Seus resultados foram semelhantes aos do curativo comercial de celulose bacteriana (Membracel®).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a ajuda de Lilo Coradaci pelo suporte técnico e Ana Cristina Lira Sobral pelas análises microscópicas.

REFERÊNCIAS

1. Agren MS, Mertz PM, Franzén L. A comparative study of three occlusive dressings in the treatment of full-thickness wounds in pigs. *J Am Acad Dermatol.* 1997 Jan;36(1):53-8. doi: 10.1016/s0190-9622(97)70325-6. PMID: 8996261.
2. Al-Shaqsi S, Al-Kashmiri A, Al-Bulushi T. Epidemiology of burns undergoing hospitalization to the National Burns Unit in the Sultanate of Oman: a 25-year review. *Burns.* 2013 Dec;39(8):1606-11. doi: 10.1016/j.burns.2013.04.012. Epub 2013 May 16. PMID: 23683661.
3. Alvarez OM, et al. Effectiveness of a biocellulose wound dressing for the treatment of chronic venous leg ulcers: results of a single center randomized study involving 24 patients. *Wounds.* 2014; 16(7), 224-233.
4. Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials.* 2006 Mar;27(9):2141-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.026. Epub 2005 Nov 28. PMID: 16310848.

5. Bhattacharya M, Malinen MM, Lauren P, Lou YR, Kuisma SW, Kanninen L, Lille M, Corlu A, GuGuen-Guillouzo C, Ikkala O, Laukkanen A, Urtti A, Yliperttula M. Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. *J Control Release.* 2012 Dec 28;164(3):291-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.039. Epub 2012 Jul 7. PMID: 22776290.
6. Fischer MR, et al. Biosynthesis and characterization of bacterial nanocellulose for tissue engineering. *Matéria (Rio J).* 2017; 22(supl.1):e-11934.
7. Fu L, Zhang J, Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr Polym.* 2013 Feb 15;92(2):1432-42. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.071. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23399174.
8. Greenhalgh DG, Sprugel KH, Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol.* 1990 Jun;136(6):1235-46. PMID: 2356856; PMCID: PMC1877595.
9. Hakkarainen T, Koivuniemi R, Kosonen M, Escobedo-Lucea C, Sanz-Garcia A, Vuola J, Valtonen J, Tammela P, Mäkitie A, Luukko K, Yliperttula M, Kavola H. Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. *J Control Release.* 2016 Dec 28;244(Pt B):292-301. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.07.053. Epub 2016 Aug 1. PMID: 27491880.
10. Hoenich N. Cellulose for medical applications: past, present and future. *Bio Resources.* 2006 1(2):270-280. https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_01_2_270_280_Hoenich_Cellulose_Medical_Review/26
11. Janis JE, Kwon RK, Lalonde DH. A practical guide to wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Jun;125(6):230e-44e. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181d9a0d1. PMID: 20517064.
12. Legeza VI, Galenko-Yaroshevskii VP, Zinov'ev EV, Paramonov BA, Kreichman GS, Turkovskii II, Gumenyuk ES, Karnovich AG, Khripunov AK. Effects of new wound dressings on healing of thermal burns of the skin in acute radiation disease. *Bull Exp Biol Med.* 2004 Sep;138(3):311-5. doi: 10.1007/s10517-005-0029-4. PMID: 15665932.
13. Lin WC, Lien CC, Yeh HJ, Yu CM, Hsu SH. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydr Polym.* 2013 Apr 15;94(1):603-11. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.01.076. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23544580.
14. Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *Eur Polym J.* 2014 Oct; 59: 302-325. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>.
15. Mandelbaum SH, Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiros Dermatologia.* 2003 78(5):393-410.
16. Mohamad N, Mohd Amin MC, Pandey M, Ahmad N, Rajab NF. Bacterial cellulose/acrylic acid hydrogel synthesized via electron beam irradiation: accelerated burn wound healing in an animal model. *Carbohydr Polym.* 2014 Dec 19;114:312-20. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.025. Epub 2014 Aug 23. PMID: 25263896.
17. Powell LC, Khan S, Chinga-Carrasco G, Wright CJ, Hill KE, Thomas DW. An investigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth on novel nanocellulose fibre dressings. *Carbohydr Polym.* 2016 Feb 10;137:191-197. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.024. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26686120.
18. Rogers AA, Walmsley RS, Rippon MG, Bowler PG. Adsorption of serum-derived proteins by primary dressings: implications for dressing adhesion to wounds. *J Wound Care.* 1999 Sep;8(8):403-6. doi: 10.12968/jowc.1999.8.8.25910. PMID: 10808851.
19. Santos Junior RA, Silva RLM, Lima GL, Cintra BB, Borges KS. Perfil epidemiológico dos pacientes queimados no Hospital de Urgências de Sergipe. *Rev Bras Queimaduras.* 2016;15(4):251-255.
20. Siqueira JJP, Moreschi JC. Membranas de celulose porosas desidratadas para curativos em úlceras, escaras e queimaduras. *Cirurgia Vascul e Angiologia.* 2000;16(5):179-180.
21. Vieira RGP. Synthesis and characterization of methylcellulose from sugar cane bagasse cellulose. *Carbohydr Polym.* 2007 Jan 67; 2:182-218. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.007>
22. Wiegand, C. and Hipler, U.-C. (2010), Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. *Macromol. Symp.*, 294: 1-13. doi: 10.1002/masy.200900028
23. World Health Organization (WHO), T. Prentice, R. Beaglehole, A. Irwin. The world health report, 2004: Changing history World Health Organization (2004).
24. Yaguishta N. Avaliação da cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa depois da retirada total da pele em dorso de ratos. *J Vasc Bras.* 2007;6(2):193-194. doi: <https://doi.org/10.1590/S1677-54492007000200018>
25. Zhang Y, et al. Cellulose nanofibrils. *J. Renewable Mater.* 2013, 3:195-211. <https://doi.org/10.7569/JRM.2013.634115>
26. Zoppel JO, Ruottinen V, Ruotsalainen J, Rönkkö S, Johansson LS, Hinkkanen A, Järvinen K, Seppälä J. Synthesis of cellulose nanocrystals carrying tyrosine sulfate mimetic ligands and inhibition of alphavirus infection. *Biomacromolecules.* 2014 Apr 14;15(4):1534-42. doi: 10.1021/bm500229d. Epub 2014 Mar 25. PMID: 24628489.