

RELATÓRIO PARA O PROCESSO DE JTEE (PÓS-DOCTORADO 3060)

Período a que se refere o relatório: 04/01/2022 a 28/02/2023

PAULO ROBERTO GABBAI ARMELIN

MEMBRANA DE BIOCELULOSE DOPADA COM PRODUTOS NATURAIS: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS ANTIMICROBIANOS E CURATIVOS *IN VITRO*

Relatório de Pós-Doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Odontologia de Araraquara,
Departamento de Odontologia Pediátrica,
Araraquara - SP

Documento assinado digitalmente



FERNANDA LOURENÇO BRIGHENTI
Data: 23/01/2024 08:37:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Dr. PAULO ROBERTO GABBAI ARMELIN
Bolsista de pós-doutorado/JTEE

Dra. FERNANDA LOURENÇO BRIGHENTI
Supervisor

CAPES – processos n. 88887.468865/2019-00 e n. 88887.571226/2020-00

ARARAQUARA - SP
2023

Resumo: Feridas na pele e queimaduras representam um problema global. Sobre isso, os fatores de complicação consistem em infecções e proliferação de micro-organismos, que podem levar à mortalidade nesta situação clínica. Nesse contexto, biopolímeros, especialmente membranas de biocelulose ou celulose bacteriana (BNC), têm despertado interesse em produtos para a saúde. Apesar das promissoras características biológicas e físico-químicas das membranas BNC, elas não apresentam atividade antimicrobiana. Nesse sentido, a combinação do carvacrol (Car) e seu isômero timol (Thy) (componentes dos óleos essenciais das plantas da família das *Lamiaceae*), tem se mostrado promissora como substâncias antimicrobianas e antioxidantes. Com base nisso, este projeto tem como objetivo caracterizar e validar, por meio de testes *in vitro*, as propriedades antimicrobianas, cicatrizantes e anti-inflamatórias das membranas BNC incorporadas com Car-Thy. As membranas de BNC foram obtidas do cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, dopadas com Car e Thy (0,1 e 1,0 mg/cm²) e processadas em construtos circulares de 5,0 cm para caracterização, estudos de citotoxicidade e proliferação celular. As membranas foram caracterizadas por ensaios mecânicos e, ainda, estudos de citotoxicidade e proliferação foram realizados com fibroblastos e queratinócitos por alamarBlue e Picogreen, após 48 e 120 h de cultura. A incorporação de componentes naturais na biocelulose não interferiu nas características mecânicas das membranas. Basicamente, estudos de cultura de células não indicaram citotoxicidade e que as células puderam proliferar em contato com extratos das membranas de BNC incorporadas com Car e Thy. Este biomaterial une o potencial cicatrizante de BNC e as propriedades antimicrobianas do Car e do Thy.

Palavras-chave: Queimaduras, Materiais biocompatíveis, Monoterpenos e Timol.

1. ETAPAS CONCLUÍDAS

- a. Aquisição de materiais;
- b. Preparo de membranas de biocelulose;
- c. Enriquecimento de membranas de biocelulose com carvacrol e timol;
- d. Caracterização mecânica das membranas;
- e. Ensaio de citotoxicidade (alamarBlue) com fibroblastos e queratinócitos;
- f. Ensaio de proliferação (dsDNA Picogreen) com fibroblastos e queratinócitos;
- g. Elaboração do relatório final e;
- h. Submissão do artigo científico intitulado “Bacterial nanocellulose membranes for codelivery of carvacrol and thymol: physico-chemical characterization and in vitro studies” em periódico internacional – *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (IF: 4.9).

2. ETAPA INICIADA E NÃO FINALIZADA

- a. Atividade anti-inflamatória com fibroblastos. Avaliações por *Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)* – reação em cadeia da polimerase – das expressões gênicas do fator de transcrição NF-kB e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6. Foram realizadas culturas e testes para definição dos períodos experimentais nos ensaios com TNF- α e IL-6. Não foi possível finalizar a avaliação da atividade anti-inflamatória em cultura de células com fibroblastos devido a atrasos no cronograma e dificuldades em estimular as células com LPS em diferentes concentrações (mais detalhes na seção ‘8. Principais Dificuldades’).

3. OBJETIVOS

Os objetivos desta proposta estão listados abaixo:

- obter membranas de biocelulose e enriquecê-las com carvacrol e timol;
- explorar as propriedades biomecânicas das membranas de BNC incorporadas com Car / Thy por meio de ensaios mecânicos;
- estudar a citotoxicidade das membranas por meio de teste *in vitro* (alamarBlue e Picogreen).

4. MATERIAIS E MÉTODOS (TAREFAS FINALIZADAS E EM ANDAMENTO)

Materiais

Os padrões de carvacrol (“Car”; $\geq 98,0\%$) e timol (“Thy”; $99,5\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO). Todos os outros produtos químicos são do tipo reagente e foram utilizados sem purificação adicional.

ETAPAS FINALIZADAS

Métodos

Obtenção de membranas de celulose bacteriana/Car-Thy

As membranas de BNC foram obtidas a partir do cultivo de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. O meio de cultura foi estabelecido por 120 h a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ em bandejas, compreendendo o meio estéril de glicose $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, extrato de levedura $4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, fosfato dissódico anidro $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sulfato de magnésio hepta-hidratado $0,8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e etanol $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Após 120 h, foram obtidas películas de BNC hidratadas. Estas membranas foram lavadas numerosas vezes com água e NaOH aquoso a 2% a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para remoção das bactérias. Em seguida, as membranas de BNC ($12 \times 14\text{ cm}$) foram imersas em frascos plásticos de 5 L, contendo etanol 70% por 24 h (BARUD HDA et al, 2013; MARQUELE-OLIVEIRA et al, 2019). Membranas de BNC dilatadas com etanol, após processamento e corte (construções circulares de $5,0$), foram utilizadas para formular as amostras de BNC/Car-Thy, nas doses de $1,0$ e $0,1\text{ mg}/\text{cm}^2$. Membranas sem as substâncias foram utilizadas como controle membrana (BNC). Os grupos experimentais do estudo estão descritos na tabela 1.

Para o preparo de membranas de $5,0\text{ cm } \varnothing$ na dose de $0,1\text{ mg}/\text{cm}^2$, $2,5\text{ mg}$ de Car ou de Thy em $600\text{ }\mu\text{L}$ de álcool PA foram adicionados a placas de silicone de $\sim 5,0\text{ cm } \varnothing$. Para o grupo BNC/Car-Thy, cada placa de silicone continha $1,25\text{ mg}$ de Car e $1,25\text{ mg}$ de Thy em $600\text{ }\mu\text{L}$ de álcool PA. Para o preparo de membranas de $5,0\text{ cm } \varnothing$ na dose de $1,0\text{ mg}/\text{cm}^2$, $25,0\text{ mg}$ de Car ou de Thy em $600\text{ }\mu\text{L}$ de álcool PA foram adicionados a placas de silicone de $\sim 5,0\text{ cm } \varnothing$. Para o grupo BNC/Car-Thy, cada placa de silicone continha $12,5\text{ mg}$ de Car e $12,5\text{ mg}$ de Thy em $600\text{ }\mu\text{L}$ de álcool PA.

Todas as membranas de BNC/Car-Thy foram secas em estufas a 37 °C por 24 h. As amostras foram identificadas de acordo com a quantidade de produto natural em suas composições, esterilizadas com radiação ultravioleta em uma das faces por 2 h e devidamente armazenadas para posterior análise.

Tabela 1. Descrição dos grupos utilizados no trabalho

<i>Grupos</i>	<i>mg/cm²</i>	<i>cm Ø</i>	<i>Car (mg)</i>	<i>Thy (mg)</i>
BNC	-	5,0	-	-
BNC/Car	0,1	5,0	2,5	-
	1,0	5,0	25,0	-
BNC/Thy	0,1	5,0	-	2,5
	1,0	5,0	-	25,0
BNC/Car-Thy	0,1	5,0	1,25	1,25
	1,0	5,0	12,5	12,5

-: ausência de Car ou Thy na composição.

Caracterização Mecânica

Ensaio mecânico. O ensaio mecânico foi realizado à temperatura ambiente (27 °C) com um Analisador Mecânico Dinâmico (DMA) 2980 (TA Instruments) equipado com um grampo de tensão de filme. As dimensões das amostras foram de 4 x 1 cm (comprimento x largura). Foi utilizada uma força de pré-carga de 0,01 N e rampa de força de 1,0 N/min até a ruptura da membrana. O aparelho foi previamente calibrado e um total de 3 medidas para cada amostra foi feita ($n = 3$).

Estudos de cultura celular

Linhagem celular. Fibroblastos humanos (L929; ATCC CCL-1) e queratinócitos epidérmicos (HaCat; ATCC PCS-200-011) foram cedidos, respectivamente, pela Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma da Universidade de Araraquara (UNIARA) e com a Dra. Paula Barbugli da UNESP/FOAr. Fibroblastos e queratinócitos foram cultivados em meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) de alta glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina-estreptomicina (10.000 U/mL). As células foram cultivadas a 37 °C com 5% de CO₂ e o meio foi trocado a cada dois dias até ser observada

confluência para investigações biológicas adicionais de citotoxicidade e proliferação por ensaios de alamarBlue e Picogreen respectivamente.

Citotoxicidade por alamarBlue. 1×10^4 células/poço para fibroblastos e queratinócitos foram semeadas em contato com os extratos das membranas em uma placa de 24 poços ($n = 6$ por grupo). Extratos de todas as membranas (dose de $0,1 \text{ mg/cm}^2$) foram obtidos por incubação dos materiais em DMEM, na proporção de $2 \text{ cm}^2/\text{mL}$ (área da membrana/volume de meio) durante 24 h, a 37° C em mesa agitadora (40 rpm) (ISO10993-5, 2009). Extratos puros de BNC foram utilizados como controle, uma vez que são estabelecidos como biocompatíveis (DE OLIVEIRA BARUD et al, 2020; DE OLIVEIRA BARUD et al, 2016; MARESTONI et al, 2020). Após 48 e 120 h de cultivo celular em contato com os extratos, as amostras foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade por alamarBlue. $200 \mu\text{L}$ de solução de alamarBlue a 10% (Thermo Scientific, Ribeirão Preto, Brasil) em DMEM alta glicose (Sigma, Brasil) foram adicionados a cada poço e incubados por 3 h. As soluções ($50 \mu\text{L}$) de cada amostra foram transferidas para uma placa de 96 poços. A fluorescência das soluções foi medida usando filtros com excitação de 485 nm e emissão de 538 nm. Os valores foram calculados como % de viabilidade utilizando o grupo BNC como controle (100%).

Proliferação por dsDNA Picogreen. A solução de alamarBlue em contato com as células foi lavada com PBS e a mesma placa de poços foi usada para quantificação de DNA pelo ensaio PicoGreen (kit Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA; Thermo Fisher, Ribeirão Preto, Brasil). Para isso, após 2 ciclos de congelamento e descongelamento das células em 1 ml de água Milli-Q (-80° C), $100 \mu\text{L}$ de solução de trabalho foram adicionados a cada poço que continha $100 \mu\text{L}$ de amostra (lisado celular de cada poço), e a placa foi mantida no escuro por 10 minutos. Por fim, o sinal fluorescente (530 nm de excitação e 485 nm de emissão) foi lido utilizando um leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek Instruments). Os valores também foram calculados como % de proliferação utilizando o grupo BNC como controle (100%).

ETAPA INICIADA E NÃO FINALIZADA

Atividade anti-inflamatória. Os fibroblastos foram cultivados em placas de 6 poços (3×10^5 células/mL) e foram estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* [Estudo 1: LPS $1,0 \mu\text{g/mL}$ + SFB 10,0%; Estudo 2: LPS $0,1 \mu\text{g/mL}$ + SFB 10,0%; Estudo 3: LPS $0,1 \mu\text{g/mL}$ + SFB 0,3% (*E. coli* O111: B4, Sigma-Aldrich)] por 6, 18 e 24 h. A expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e interleucina-6 (IL-6) foi medida

por PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR). Para tanto, o RNA foi isolado, utilizando um *Total RNA Purification Kit* (Cellco, São Carlos, Brasil) de acordo com as instruções do fornecedor. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total com um kit de transcrição reversa de cDNA High Capacity (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). A expressão gênica foi avaliada por qPCR em equipamento StepOne (Applied Biosystems), utilizando TaqMan, primers e conjuntos de *probe sets* (Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Duplicatas foram preparadas para cada reação, e o experimento foi repetido três vezes de forma independente. A determinação dos níveis relativos de expressão gênica foi realizada através do método do limiar do ciclo comparativo (ΔC_t) e normalizada para o gene de referência Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

ANÁLISE DOS DADOS

O método de Shapiro-Wilk foi utilizado para teste de normalidade. A análise de variância (ANOVA) com teste *post hoc* de Tukey foi aplicada para estudos mecânicos. Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn foram utilizados para dados não paramétricos (cultura de células). Todas as análises foram realizadas usando GraphPad Prism 8.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA). Para todos os testes foi considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

Ensaio mecânico.

O ensaio mecânico das membranas, utilizando DMA 2980, indicou tensão de ~ 37,0 a 44,6 MPa e distensão de 1,2 a 1,7 % para todos os grupos (Tabelas 2 e 3 respectivamente). Não houve diferença entre os grupos tanto para estresse quanto para distensão ($p > 0,05$).

Tabela 2. Média±DP do **estresse (MPa)** e da **distensão (%)** das membranas até o momento da ruptura ($n = 3$)

	MPa	%
<i>BNC</i>	44.65±1.71 ^a	1.67±0.30 ^a
<i>BNC/Car 0.1</i>	39.19±4.53 ^a	1.34±0.17 ^a
<i>BNC/Thy 0.1</i>	42.63±5.55 ^a	1.43±0.21 ^a
<i>BNC/Car-Thy 0.1</i>	37.04±2.69 ^a	1.22±0.10 ^a
<i>BNC/Car 1.0</i>	44.16±4.44 ^a	1.70±0.29 ^a
<i>BNC/Thy 1.0</i>	37.91±0.10 ^a	1.56±0.08 ^a
<i>BNC/Car-Thy 1.0</i>	41.56±2.88 ^a	1.55±0.04 ^a

$p > 0.05$; (one-way ANOVA); “a” – sem diferenças estatísticas entre grupos.

Citotoxicidade por alamarBlue.

Testes de citotoxicidade por alamarBlue não indicaram diferença estatística entre os grupos após 2 dias de cultura de fibroblastos ($p > 0,05$; Tabela 3). Em contraste, maior viabilidade celular da L929 para BNC, em comparação com BNC/Car-Thy 0,1, foi encontrada após cinco dias de semeadura ($p = 0,0033$; Tabela 3). Nesse mesmo período, nenhuma outra diferença estatística foi verificada entre os grupos ($p > 0.05$). Fibroblastos puderam proliferar em contato com extratos de biomateriais, mesmo na presença de monoterpenos naturais, indicando ausência de citotoxicidade das membranas BNC incorporadas com Car e Thy.

Tabela 3. Mediana e quartis [Q1; Q3] (%) para fibroblastos (L929) depois de 2 e 5 dias de cultura

	BNC	BNC/Car 0.1	BNC/Thy 0.1	BNC/Car-Thy 0.1
2 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^a	102.9 [98.7; 114.6] ^a	104.9 [99.9; 113.7] ^a	101.6 [94.5; 104.9] ^a
5 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^b	96.9 [93.8; 99.0] ^{b,c}	96.3 [94.7; 105.3] ^{b,c}	91.7 [86.4; 93.8] ^c

Kruskal-Wallis com Dunn's multiple comparison test ($n = 6$ por grupo). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0.05$) dentro de um mesmo período. Para as outras comparações $p > 0.05$.

Ensaio de citotoxicidade por alamarBlue não mostraram diferença estatística significativa entre a viabilidade celular após 2 e 5 dias de cultivo para HaCat ($p > 0,05$; Tabela 4). Curiosamente, cinco dias após a semeadura, todos os grupos de monoterpenos apresentaram tendências para maiores valores de viabilidade em relação ao BNC. Estas observações sugerem que os queratinócitos puderam proliferar na presença dos monoterpenos naturais, não demonstrando citotoxicidade destas membranas de BNC incorporadas com Car e Thy (Tabela 4).

Tabela 4. Medianas e quartis [Q1; Q3] (%) para queratinócitos (HaCat) depois de 2 e 5 dias de cultura

	BNC	BNC/Car 0.1	BNC/Thy 0.1	BNC/Car-Thy 0.1
2 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^a	84.1 [81.8; 86.9] ^a	97.7 [74.6; 108.6] ^a	98.9 [86.8; 111.2] ^a
5 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^b	112.7 [103.8; 129.9] ^b	121.6 [94.5; 177.1] ^b	130.6 [115.1; 181.9] ^b

Kruskal-Wallis com Dunn's multiple comparison test ($n = 6$ por grupo). Sem diferenças estatísticas significantes entre grupos dentro de um mesmo período $p > 0.05$.

Proliferação por dsDNA Picogreen.

Testes de proliferação por PicoGreen indicaram redução no grupo BNC/Car-Thy 0,1 comparado ao BNC, após 2 dias de cultura de fibroblastos ($p = 0,0038$; Tabela 5). Além disso, maior proliferação de L929 foram encontradas após cinco dias de semeadura para BNC e BNC/Thy 0,1, em comparação com BNC/Car-Thy 0,1, (valores de p 0,0080 e 0,0092, respectivamente; Tabela 5). Nenhuma outra diferença estatística foi detectada entre os grupos ($p > 0.05$) em ambos os períodos. Fibroblastos puderam proliferar em contato com extratos dos biomateriais, mesmo junto com os monoterpenos naturais, exceto o grupo BNC/Car-Thy 0.1.

Tabela 5. Medianas e quartis [Q1; Q3] (%) para DNA de fibroblastos (L929) depois de 2 e 5 dias de cultura

	BNC	BNC/Car 0.1	BNC/Thy 0.1	BNC/Car-Thy 0.1
2 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^a	85.2 [58.8; 105.2] ^{a,b}	67.8 [45.2; 87.1] ^{a,b}	58.0 [30.2; 65.2] ^b
5 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^c	78.5 [58.4; 100.5] ^{c,d}	90.5 [57.6; 106.4] ^c	40.4 [16.7; 52.6] ^d

Kruskal-Wallis com Dunn's multiple comparison test ($n = 6$ por grupo). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0.05$) dentro de um mesmo período. Para as outras comparações $p > 0.05$.

Ensaio de proliferação por PicoGreen mostraram diferença estatística entre BNC vs. BNC/Car 0,1 e BNC/Thy 0,1 após 2 dias de cultura de queratinócitos ($p = 0,0171$; Tabela 6). Além disso, proliferações de HaCat ligeiramente diminuídas foram detectadas para BNC/Car 0,1 em comparação com BNC, após cinco dias de semeadura ($p = 0,0450$; Tabela 6). Os queratinócitos puderam proliferar em cultura com extratos do biomaterial, mesmo contendo os monoterpenos naturais, exceto o grupo BNC/Car 0.1.

Tabela 6. Medianas e quartis [Q1; Q3] (%) para DNA de queratinócitos (HaCat) depois de 2 e 5 dias de cultura

	BNC	BNC/Car 0.1	BNC/Thy 0.1	BNC/Car-Thy 0.1
2 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^a	63.1 [53.3; 78.2] ^b	64.1 [51.4; 75.5] ^b	68.8 [61.5; 84.7] ^{a,b}
5 dias	100.0 [100.0; 100.0] ^c	65.7 [51.9; 73.6] ^d	89.5 [46.7; 116.0] ^{c,d}	61.1 [31.2; 114.3] ^{c,d}

Kruskal-Wallis com Dunn's multiple comparison test ($n = 6$ por grupo). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p < 0.05$) dentro de um mesmo período. Para as outras comparações $p > 0.05$.

Estudos "time-course" para definição dos períodos experimentais dos ensaios com TNF- α e IL-6, após estímulo com LPS.

Nessa etapa, foram realizados três experimentos variando-se a concentração de LPS (0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) e de soro fetal bovino (0,3 e 10%) para determinar qual o período experimental ideal para tratar e analisar a expressão de TNF- α e IL-6 após estímulo com LPS.

Estudo 1: LPS 1,0 $\mu\text{g/mL}$ + SFB 10,0%

No Estudo 1, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as células L929 estimuladas por LPS 1,0 $\mu\text{g/mL}$ e as células não estimuladas (controle), tanto para TNF- α como IL-6 ($p > 0,05$) (Figuras 1 e 2).

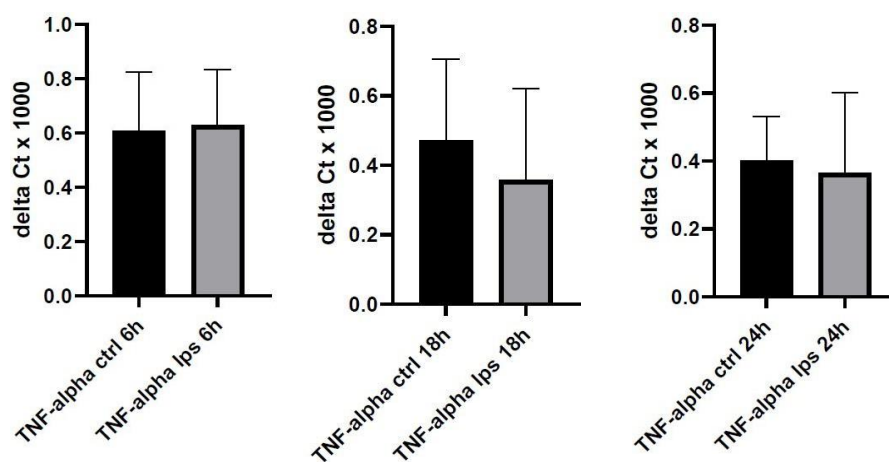


Figura 1 (Estudo 1). Expressão de TNF- α para células L929 controle (“ctrl”; não estimuladas) e estimuladas com 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (“LPS”), após 6, 18 e 24 h de cultura. Kruskal-Wallis com Dunn’s multiple comparison test; $p > 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

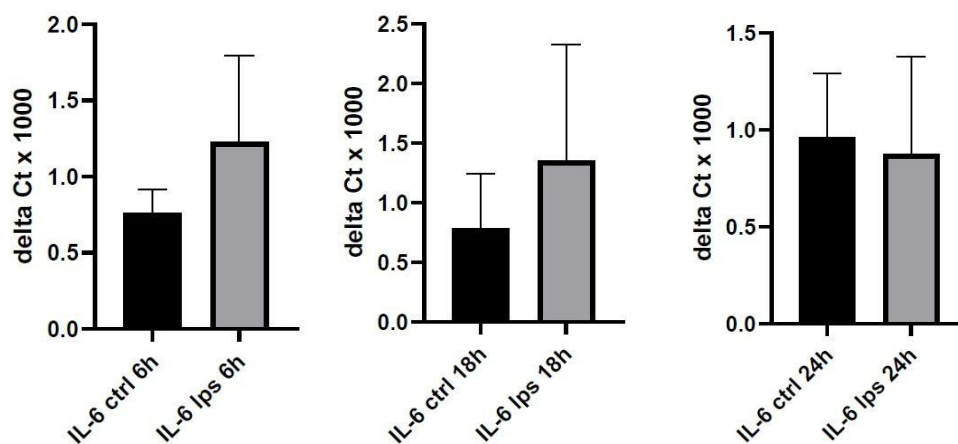


Figura 2 (Estudo 1). Expressão de IL-6 para células L929 controle (“ctrl” não estimuladas) e estimuladas com 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (“LPS”), após 6, 18 e 24 h de cultura. Kruskal-Wallis com Dunn’s multiple comparison test; $p > 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

Estudo 2: LPS 0,1 µg/mL + SFB 10,0%

Nesse estudo, buscou-se uma menor concentração de LPS para não se hiperestimular as células. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre a células L929 estimuladas e as células controle não estimuladas (Figuras 3 e 4). Dessa maneira, um terceiro estudo foi realizado com ajuste na concentração de SFB, Estudo 3).

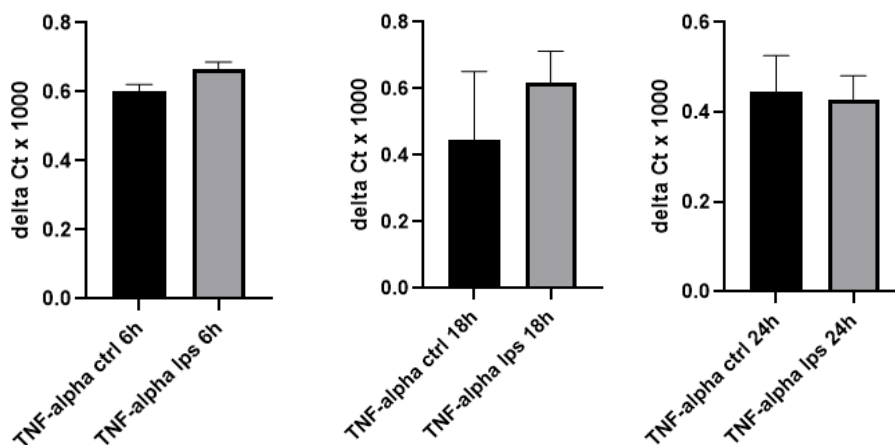


Figura 3 (Estudo 2). Expressão de TNF-α para células L929 controle (“ctrl”; não estimuladas) e estimuladas com 0,1 µg/mL (“LPS”), após 6, 18 e 24 h de cultura. Kruskal-Wallis com Dunn’s multiple comparison test; $p > 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

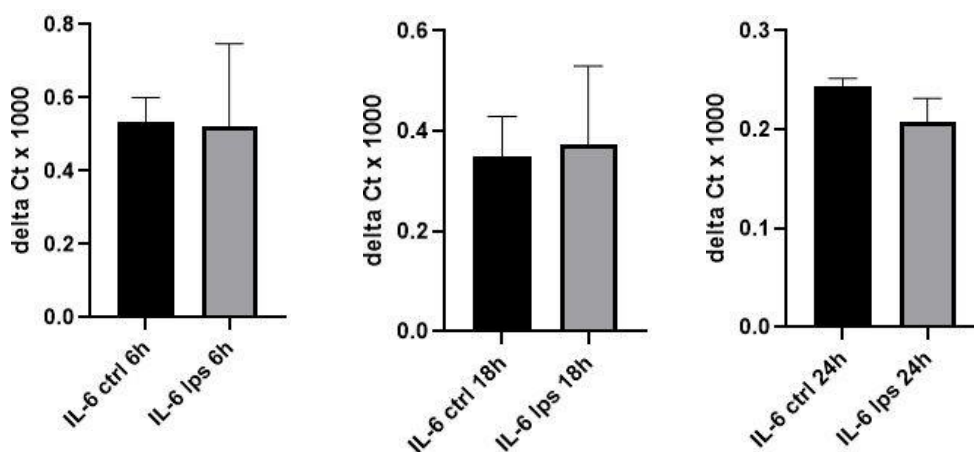


Figura 4 (Estudo 2). Expressão de IL-6 para células L929 controle (“ctrl” não estimuladas) e estimuladas com 0,1 µg/mL (“LPS”), após 6, 18 e 24 h de cultura. Kruskal-Wallis com Dunn’s multiple comparison test; $p > 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

Estudo 3: LPS 0,1 µg/mL + SFB 0,3%

Nesse estudo, a concentração de SFB foi reduzida para 0,3%, pois a literatura mostra que o SFB pode inativar o estímulo por LPS (OHKI et al, 1999; YANG et al, 2020). No entanto, ainda não foram verificadas diferenças estatísticas entre as células L929 estimuladas com LPS e as células controle (Figuras 5 e 6).

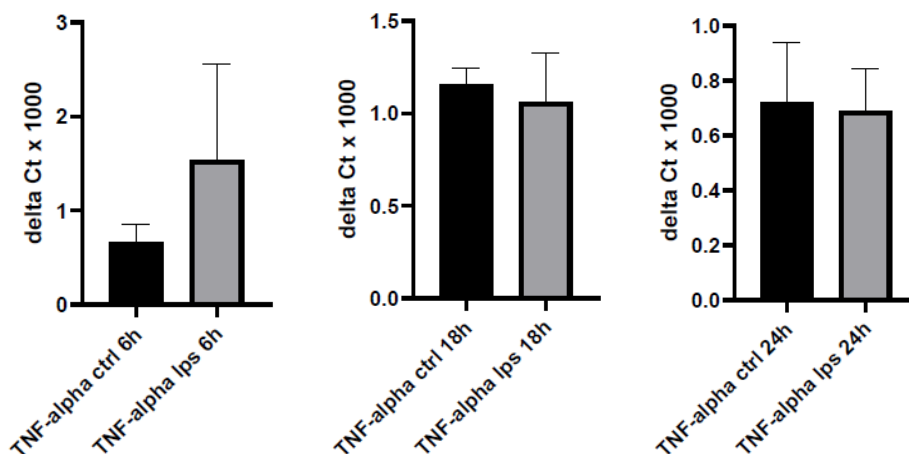


Figura 5 (Estudo 3). Expressão de TNF-α para células L929 controle (“ctrl”; não estimuladas) e estimuladas com 0,1 µg/mL (“LPS”) e 0,3% SFB, após 6, 18 e 24 h de cultura. Kruskal-Wallis com Dunn’s multiple comparison test; $p > 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

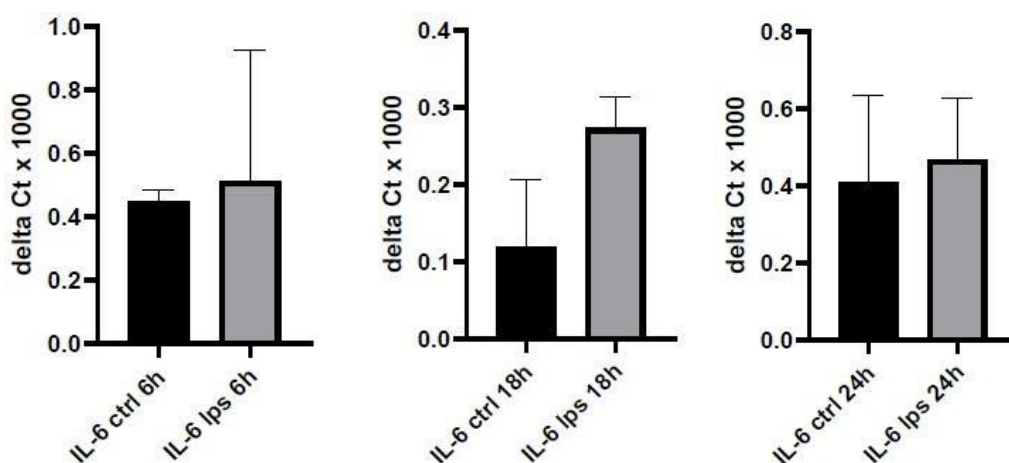


Figura 6 (Estudo 3). Expressão de IL-6 para células L929 controle (“ctrl”; não estimuladas) e estimuladas com 0,1 µg/mL (“LPS”) e 0,3% SFB, após 6, 18 e 24 h de cultura. Kruskal-Wallis com Dunn’s multiple comparison test; $p > 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

Assim, não foi possível a determinação dos períodos experimentais e dar prosseguimento da PCR para os estudos da modulação anti-inflamatória das membranas de BNC/Car-Thy sobre as células L929 estimuladas com LPS.

6. DISCUSSÃO

As membranas de BNC incorporadas com Car e Thy foram produzidas nas doses de 1,0 e 0,1 mg/cm². A incorporação de monoterpenos naturais à biocelulose, como verificado no ensaio mecânico, não influenciou na nanoestrutura biomecânica das membranas. Esta pesquisa sugeriu que a incorporação de produtos naturais seria biocompatível e levaria a alguma proliferação celular (COSTA et al, 2019).

Ensaio de citotoxicidade e proliferação mostraram que, na maioria dos casos, os dois tipos celulares puderam crescer e proliferar nas membranas de Car-Thy, sugerindo não haver citotoxicidade das membranas. As duas únicas exceções, de acordo com testes de Picogreen, foram os grupos BNC/Car-Thy 0.1 e BNC/Car 0.1 para L929 e HaCat respectivamente. Nesse caso, ainda vale ressaltar que, como já descrito, discrepâncias podem ser encontradas em relação ao metabolismo de proliferação celular e fluoróforos de ligação ao DNA (QUENT et al, 2010).

De acordo com o presente estudo, Aragon et al. 2019 também verificou que as membranas de policaprolactona (PCL)/acetato de polivinila (PVAc) carregadas com Car não foram citotóxicas aos fibroblastos após 48 h (ARAGON et al, 2019). Além disso, outra investigação de Miguel et al. 2019 – usando membranas de fibroína de seda/PCL/ácido hialurônico, carregado com Thy - também indicou que os fibroblastos aderiram e se espalharam sobre as membranas (MIGUEL et al, 2019).

No que se refere aos queratinócitos, Pivetta e coautores produziram um gel biocompatível de carbopol, também contendo Thy, e demonstraram viabilidade em testes de cultura com utilização dessa linhagem celular (PIVETTA et al, 2018). Ainda, Manconi e colaboradores também observaram que um óleo essencial (composto principalmente de Car), incorporado a vesículas fosfolipídicas, não foi tóxico para queratinócitos (MANCONI et al, 2018), como nos casos dos grupos BNC/Thy 0,1 e BNC/Car-Thy 0,1 em contato com as HaCat.

Adicionalmente, no presente estudo, foram observadas tendências de aumento da viabilidade celular,

principalmente nos testes de alamarBlue, para os queratinócitos quando comparados ao grupo BNC. Assim, esse estudo traz novos *insights* e possibilidades acerca da adição de substâncias ativas naturais nas membranas de nanocelulose bacteriana para se otimizar sua performance na cura de feridas, sem alterar ou afetar suas características físico-químicas. Dessa maneira, mais estudos, incluindo investigações de biologia molecular *in vitro* e *in vivo*, devem ser executados para se investigar o potencial e mecanismo de ação, além da modulação anti-inflamatória de BNC incorporadas com Car-Thy.

7. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Além das etapas descritas anteriormente, o beneficiário Dr. Paulo R. Gabbai-Armelin publicou os seguintes artigos no período de fomento do projeto:

- MORAIS, DIEGO C.; FONTES, MARINA L.; OLIVEIRA, ANALÚ B.; **GABBAI-ARMELIN, PAULO R.**; FERRISSE, TÚLIO M.; DE OLIVEIRA, LUIZ F. C.; BRIGHENTI, FERNANDA LOURENÇÃO; BARUD, HERNANE S.; DE SOUSA, FREDERICO B. **Combining Polymer and Cyclodextrin Strategy for Drug Release of Sulfadiazine from Electrospun Fibers** . PHARMACEUTICS (IF: 6.5), v.15, p. 1890, 2023.
- **GABBAI-ARMELIN, PAULO R.**; SALES, LUCIANA S. ; FERRISSE, TÚLIO MORANDIN ; DE OLIVEIRA, ANALU BARROS; DE OLIVEIRA, JULIANA R. ; GIRO, ELISA M. A ; BRIGHENTI, FERNANDA L. . **A systematic review and meta-analysis of the effect of thymol as an anti-inflammatory and wound healing agent**. PHYTOTHERAPY RESEARCH (IF: 6.4), v. 36, p. 3415-3443, 2022.
- **GABBAI-ARMELIN, P.R.**; OLIVEIRA, ANALÚ BARROS ; FERRISSE, TÚLIO MORANDIN ; SALES, LUCIANA SOLERA ; BARBOSA, ELIS RODRIGUES OLIVEIRA ; MIRANDA, MARINA LINS ; SALOMÃO, KARINA BORGES ; BRIGHENTI, FERNANDA LOURENÇÃO . COVID-19 (SARS-CoV-2) infection and thrombotic conditions: **A systematic review and meta-analysis**. EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION (IF: 5.7), v. 51, p. e13559, 2022.
- MIRANDA, MARINA LINS ; SILVA, BIANCA NÚBIA SOUZA ; SALOMÃO, KARINA BORGES ; DE OLIVEIRA, ANALÚ BARROS ; **GABBAI-ARMELIN, P.R.** ; BRIGHENTI, FERNANDA LOURENÇÃO . Effect of arginine on microorganisms involved in dental caries: a systematic literature review of in vitro studies. BIOFOULING (IF: 3.8), v. 36, p. 696-709, 2020.

8. PRINCIPAIS DIFICULDADES

As principais dificuldades encontradas foram relacionadas ao longo prazo para a chegada de materiais importados utilizados nos testes de Biologia Molecular (RT-qPCR) e às dificuldades em se estimular as células com LPS em diferentes concentrações. Mesmo após a realização de três estudos para definir os períodos experimentais dos ensaios com TNF- α e IL-6 depois do estímulo com LPS (vide Estudos “time-course”), com ajuda próxima da supervisão e colaboradores, e embasados na literatura, constatou-se que, em nenhum período experimental, que as células estimuladas com diferentes concentrações de LPS apresentaram uma expressão mais elevada de citocinas, quando comparadas às células não estimuladas. Este cenário levou à interrupção dos estudos de atividade inflamatória com fibroblastos.

9. REFERÊNCIAS

ARAGON, J. et al. Electrospun asymmetric membranes for wound dressing applications. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 103, p. 109822, Oct 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31349490>. Acesso em: 13.nov.2023.

BARUD HDA, S. et al. Antimicrobial Brazilian Propolis (EPP-AF) Containing Biocellulose Membranes as Promising Biomaterial for Skin Wound Healing. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2013, p. 703024, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23840264>. Acesso em: 13.nov.2023.

COSTA, M. F. et al. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 71, n. 2, p. 141-155, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jphp.13054>. Acesso em: 13.nov.2023.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. Bacterial Nanocellulose in Dentistry: Perspectives and Challenges. **Molecules**, 26, n. 1, Dec 24 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33374301>. Acesso em: 13.nov.2023.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G. et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydr Polym**, 153, p. 406-420, Nov 20 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27561512>. Acesso em: 13.nov.2023.

ISO10993-5. Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. 2009. Acesso em: 13.nov.2023.

MANCONI, M. et al. Thymus essential oil extraction, characterization and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/antibacterial treatment of oral cavity diseases. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 171, p. 115-122, 2018/11/01/ 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776518304685>. Acesso em: 13.nov.2023.

MARESTONI, L. D. et al. Commercial and potential applications of bacterial cellulose in Brazil: ten years review %J Polímeros. 30, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282020000400502&nrm=iso. Acesso em: 13.nov.2023.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, 136, p. 570-578, 2019/09/01/ 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019311559>. Acesso em: 13.nov.2023.

MIGUEL, S. P. et al. Production and characterization of electrospun silk fibroin based asymmetric membranes for wound dressing applications. **Int J Biol Macromol**, 121, p. 524-535, Jan 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30316771>. Acesso em: 13.nov.2023.

OHKI, K. et al. Suppressive effects of serum on the LPS-induced production of nitric oxide and TNF- α by a macrophage-like cell line, WEHI-3, are dependent on the structure of polysaccharide chains in LPS. 77, n. 2, p. 143-152, 1999. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1440-1711.1999.00807.x>. Acesso em: 13.nov.2023.

PIVETTA, T. P. et al. Development of nanoparticles from natural lipids for topical delivery of thymol: Investigation of its anti-inflammatory properties. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 164, p. 281-290, Apr 1 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29413607>. Acesso em: 13.nov.2023.

QUENT, V. M. et al. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. **J Cell Mol Med**, 14, n. 4, p. 1003-1013, Apr 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3823131/>. Acesso em: 13.nov.2023.

YANG, N. et al. Various factors affect lipopolysaccharide sensitization in cell cultures. 69, n. 2, p. 126-132, 2020. Disponível em: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.2144/btn-2020-0043>. Acesso em: 13.nov.2023.