

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Clíscea Tereza Corso

**Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade
de lentes de contato à base de celulose bacteriana com adição de
complexos fármacos-ciclodextrinas**

Araraquara
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Clíscea Tereza Corso

**Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade
de lentes de contato à base de celulose bacteriana com adição de
complexos fármacos-ciclodextrinas**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia
Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do grau de Farmacêutica
Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

**Araraquara
2013**

SUMÁRIO

I-) RESUMO.....	3
II-) LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	4
III-) LISTA DE TABELAS.....	5
IV-) LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	7
V-) INTRODUÇÃO.....	8
VI-) OBJETIVOS.....	20
VII-) MATERIAL E MÉTODOS.....	20
VIII-) RESULTADOS.....	36
IX-) DISCUSSÃO.....	46
X-) CONCLUSÃO.....	49
XI-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

I-) RESUMO

Nos últimos anos, a biotecnologia tem proporcionado avanços no desenvolvimento de biomateriais a serem utilizados como dispositivos médicos. Dentre esses dispositivos, podemos destacar aqueles que promovem a reparação tecidual e, também, a liberação controlada de fármacos. Partindo deste propósito, lentes de contato à base de celulose bacteriana (CB) foram desenvolvidas, visando o efeito curativo e reparativo para doenças da superfície ocular. A adição de ciclodextrinas (CDs) e fármacos, como o ciprofloxacino (CP) e o diclofenaco de sódio (DS) á essas lentes proporcionando propriedades terapêuticas e de liberação controlada dos fármacos. No entanto, para certificar-se do uso seguro desses compósitos pela indústria de dispositivos médicos, é necessário verificar se não possuem atividade citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica.

Sendo assim, a proposta do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma adição eficaz de fármacos às lentes de contato de CB, para que sejam liberados de maneira controlada e, também, a verificação de sua biossegurança. Para essa verificação foram realizados ensaios *in vitro* de citotoxicidade (ensaio com o kit XTT e Sobrevivência Clonogênica), genotoxicidade (ensaio Cometa) e mutagenicidade (teste do Micronúcleo) com os respectivos. Após a análise estatística dos resultados foi possível verificar que o material CB-CP apresentou efeito citotóxico e os materiais CB-DS e CB-CD-DS apresentaram efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico. Essa informação é fundamental para uma futura utilização segura desse biomaterial pela indústria de dispositivos médicos.

II-) LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura linear da celulose. As linhas pontilhadas esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis_____	8
Figura 2: a) Manta de CB úmida. B) Imagem de microscopia eletrônica de varredura da CB (ampliação de 10.000x)_____	9
Figura 3: Curativo comercial de CB_____	10
Figura 4 Estrutura (a) e respectivos volumes da cavidade interna (b) das CDs (estruturas α , β e γ)_____	14
Figura 5: Complexos fármaco-CDs_____	15
Figura 6: Conversão do sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em composto formazan (cor laranja)_____	18
Figura 7: Cortador manual das membranas utilizado para a obtenção das esferas de 7 mm_____	24
Figura 8: Gráfico da curva padrão do DS_____	26
Figura 9: Gráfico da curva padrão do CP_____	29
Figura 10: Exemplos de diferentes intensidades de danos causados às células__	34
Figura 11: A seta mostra uma célula binucleada com um micronúcleo. Do lado direito está a imagem do campo claro, evidenciando um único citoplasma que comporta os dois núcleos e o micronúcleo_____	36
Figura 12: Gráfico das curvas de liberação de DS para as amostras CB+DS (celulose bacteriana + diclofenaco de sódio) e CB+CD+DS (celulose bacteriana+hidroxipropil- γ -ciclodextrina+ ciclofenaco de sódio)_____	37
Figura 13: Gráfico com diminuição da escala de tempo do gráfico da figura 12__	38

Figura 14: Gráfico das curvas de liberação de CP para as amostras CB+CP (celulose bacteriana + cloridrato de ciprofloxacino) e CB+CD+CP (celulose bacteriana+hidroxipropil- γ -ciclodextrina+ cloridrato de ciprofloxacino)_____39

Figura 15: Diminuição da escala de tempo do gráfico da figura 12_____39

Figura 16: Citotoxicidade avaliada pelo método XTT. Colunas indicam o valor médio da absorbância a 492nm normalizado a 690nm. Barras indicam o erro padrão. Letra minúscula representa diferença estatisticamente significativa (a= $p<0,01$; b= $p<0,05$) em relação ao CN de acordo com os testes de Tukey e Dunnet_____41

Figura 17: Viabilidade celular avaliada pelo método XTT. CN representa 100% de viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. Letra minúscula representa diferença estatisticamente significativa (a= $p<0,01$; b=0,05) em relação ao Controle Negativo. Teste de Tukey e Dunnet_____41

Figura 18: Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). Barras indicam o erro padrão.Letra minúscula representa diferença estatisticamente significativa (a= $p<0,01$; b= $p<0,05$) em relação ao CN de acordo com os testes de Tukey e Dunnet_____42

Figura 19: Genotoxicidade avaliada pelo Cometa. Colunas indicam o valor médio da Porcentagem de DNA na cauda. Barras indicam o erro padrão. Os símbolos (*) representam diferença estatisticamente significativa ($p<0,01$) em relação ao CN de acordo com o teste de Tukey.A presença de ** indica genotoxicidade moderada (CB-DS e CB-CD-DS) e *** genotoxicidade elevada (Doxo e H_2O_2)_____44

III-) LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação das massas de fármaco e/ou CD a serem incorporados_____	22
Tabela 2: Valores para construção da curva padrão do DS_____	25
Tabela 3: Valores para construção da curva padrão do CP_____	28
Tabela 4: Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Micronucleadas e Frequência de Micronúcleos(FMN) obtidas de cada tratamento com os materiais e controles_____	45

IV-) LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α CD Alfa Ciclodextrina

ABS Absorbância

β CD Beta Ciclodextrina

γ CD Gama Ciclodextrina

CB Celulose Bacteriana

CDs Ciclodextrina

CN Controle Negativo

CP Ciprofloxacino

DS Diclofenaco de Sódio

Doxo Cloridrato de Doxorrubicina

LCT Lentes de Contato Terapêuticas

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

HP- γ -CD Hidroxipropil- gama- ciclodextrina

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

SFB Soro Fetal Bovino

V-) INTRODUÇÃO

IV. 1-) Celulose Bacteriana

A celulose é o biopolímero mais abundante no mundo com uma produção estimada de 10^{11} toneladas por ano e de grande importância econômica (Astley *et al*, 2001). Ela pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em plantas verdes, fungos, protozoários, e procariontes (Klemm *et al.*, 2001). Sua estrutura (Figura 1) é constituída por unidades de β -D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4).

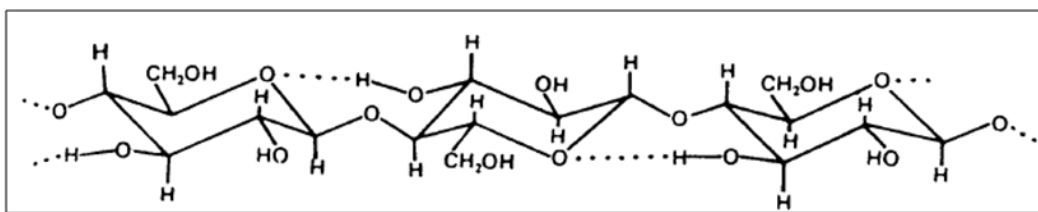


Figura 1: Estrutura linear da Celulose. As linhas pontilhada esquematizam as ligações de hidrogênio possíveis. Fonte : http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000400021

A CB é obtida por meio de rotas de biossíntese de alguns gêneros de bactérias como *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*. A forma de obtenção da CB a torna livre de impurezas (lignina e hemicelulose) além de diminuir o custo final do produto. A *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*) é uma bactéria gram-negativa quimioheterotrófica, que pode ser cultivada em um meio líquido a partir de várias fontes de carbono e nitrogênio, mas que basicamente utiliza a glicose. Em um meio de cultura apropriado este microrganismo produz fibras muito finas de celulose que se entrelaçam formando uma manta (Figura 2a) na interface meio de cultura-ar (Brown *et al.*, 1976; Valla *et al.*, 1989).

A celulose sintetizada pelas bactérias é microcristalina, apresenta capacidade de absorção de água superior à celulose vegetal, apresenta maior resistência mecânica quando hidratada e também apresenta estrutura formada de microfibrilas de espessura nanométrica (Klemm et al., 2001) (Figura 2b). Ao contrário de outros tipos de membrana sintética, a membrana de CB exibe uma alta resistência à corrosão química, é biodegradável, biocompatível, porosa, e, ainda possui boa resistência mecânica (Geyer et al., 1994). Além disso, ela possui grande capacidade de retenção de líquidos, propriedade importante para aplicações médicas e de engenharia de tecidos (Palsson e Bhatia, 2003).

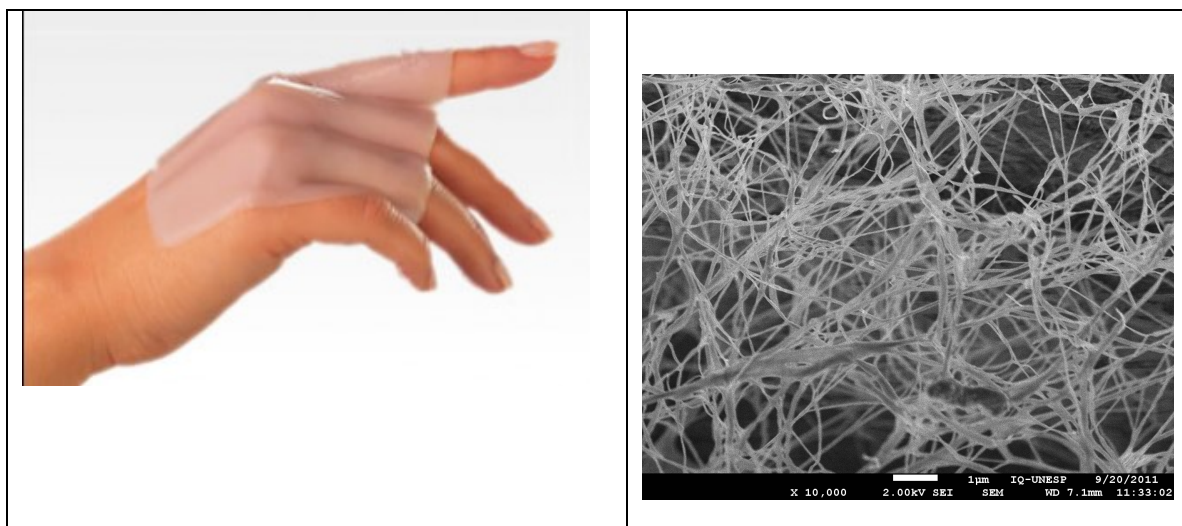


Figura 2: a) *Manta de CB úmida*. Fonte: <http://www.msahospitalar.com.br/web/membracel/> b) *Imagem de microscopia eletrônica de varredura da CB (ampliação de 10.000x).*

A celulose produzida por bactérias é um polímero que tem despertado grande interesse na área médica e vem sendo estudada para ser utilizada como biomaterial em diversas aplicações da engenharia de tecidos devido às suas propriedades vantajosas (Fontana et al., 1990; Watanabe et al., 1993; Klemm et al., 2001; Svensson et al., 2005; Backdahl et al., 2006; Czaja et al., 2006; Helenius et al., 2006; Backdahl et al., 2008; Rambo et al., 2008; Fink et al., 2010; Zaborowska et al., 2010; Andrade et al., 2011; De Souza et al., 2011; Fink et al., 2011; Pertile et al.,

2011; Petersen e Gatenholm, 2011; Recouvreux et al., 2011; Zahedmanesh et al., 2011; Pertile et al., 2012).

Desde a década de 80, a principal aplicação das membranas de celulose quer sejam hidratadas da forma como saem do meio de cultura, quer sejam secas, tem sido na substituição temporária da pele e no tratamento de queimaduras e feridas de difícil cicatrização (Sobrinho, 1989; Moreschi, 1993; Czaja, 2006; Vieira et al. 2007). Os resultados que se obtêm são muito interessantes e duas empresas comercializam estes curativos avançados no Brasil, embora a utilização ainda seja muito pequena

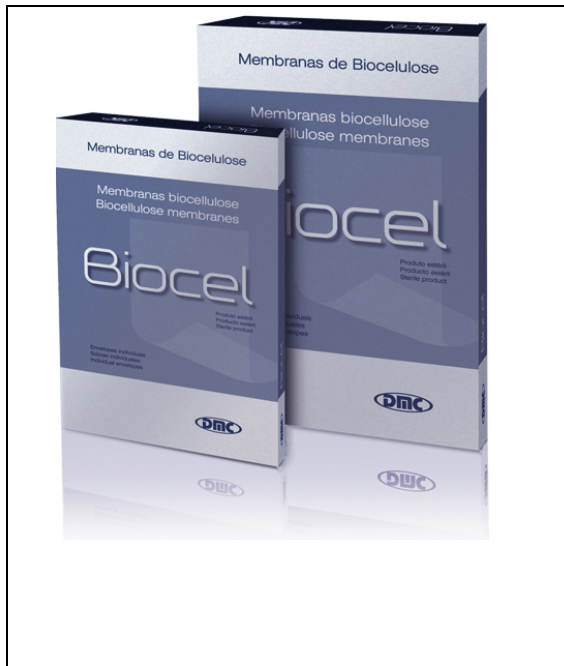


Figura 3: Curativo comercial de celulose bacteriana.

Fonte:

<http://www.dmcgroup.com.br/br/detalheproduto/medica/cirurgia-de-coluna/materiais-consumiveis/biocel/458>

IV. 2-) Lentes de contato terapêuticas

As lentes de contato terapêuticas (LCT) são úteis para o tratamento de uma série de doenças da superfície ocular, como a ceratopatia bolhosa, erosão recorrente do epitélio corneano, olho seco e defeitos epiteliais pós-operatórios. Suas principais finalidades são: reduzir a exposição de terminações nervosas corneanas,

e conseqüentemente, a dor; proteger a córnea; auxiliar a cicatrização epitelial; restaurar a câmara anterior, em ferimentos perfurantes corneanos; e liberar medicamentos na superfície ocular. Há uma variedade de tipos e materiais, sendo que a escolha depende da doença a ser tratada, tempo de uso e necessidades fisiológicas do olho doente (Hui et al., 2008; Boone et al., 2009).

As LCT como vetor para liberação de fármacos também têm sido utilizadas empregando-se diversas substâncias na superfície ocular em combinação com antibióticos e/ou anti-inflamatórios em forma de colírios, promovendo o aumento do tempo de permanência dos mesmos no local (Boone, et al. 2009). Para tanto, pesquisadores têm proposto o uso de lentes de contato como sistema de liberação de fármacos oftálmicos (antibiótico ou antiinflamatório) para aumentar o tempo de permanência dos mesmos na córnea reduzindo os desperdícios e minimizando os efeitos secundários (Jain et al., 1988; Mark et al., 1989; Xinming et al., 2008).

Algumas metodologias têm sido estudadas para incorporação de medicamentos utilizando hidrogéis poliméricos para lentes de contato como o pHEMA (polihidroxetilmetacrilato) com as seguintes finalidades/propriedades: 1.) absorção e posterior liberação do fármaco; 2.) capacidade de adaptação à córnea permitindo o carreamento do fármaco seco ou em solução; 3.) superfície modificada da lente de contato para imobilizar o fármaco nessa superfície; 4.) contendo íons ligantes ou marcados molecularmente (Jain et al., 1988). Atualmente o pHEMA tem sido o polímero de escolha para este tipo de estudo devido ao seu elevado conteúdo de água que permite a absorção de alguns medicamentos pela simples imersão em soluções concentradas ou a direta aplicação pelo colírio, e é amplamente utilizado na preparação de LCT na forma carreadora de fármacos, para o tratamento tanto de

doenças crônicas (glaucoma) quanto agudas (processos inflamatórios) (Jain et al., 1988; Hiratani e Alvarez-Alonso, 2004; Kapoor e Chauhan, 2008).

IV. 3-) Lentes de CB

Considerando-se suas propriedades terapêuticas, a celulose bacteriana também tem um grande potencial para aplicação como LCT e poderia, a princípio, proteger a córnea após um procedimento cirúrgico ou em casos de queimaduras. A CB é um hidrogel polimérico de alta cristalinidade e boa resistência à tração, elasticidade, durabilidade, elevada capacidade de absorção e retenção de água e permeabilidade ao oxigênio. Sua eficácia poderia ser otimizada com um sistema de liberação de fármacos, pois a CB é um hidrogel conformacionável com aplicações médicas relatadas na literatura e de possível incorporação de agentes antimicrobianos (Barud et al., 2007; Barud et al., 2008).

Para se obter sucesso quanto à propriedade terapêutica da LCT à base de CB desenvolvida, é necessário que a concentração do fármaco a ser liberado na área infectada ou inflamada seja ideal e pelo período suficiente para que sua ação seja eficaz.

Em regiões pouco vascularizadas como a ocular, quando esta sofre uma infecção, tem-se observado que se for administrado um fármaco por via sistêmica este não terá uma ação eficiente no local infectado (Reddy 1996; Pinto-Alphandary, 2000). Assim, os antibióticos ou anti-inflamatórios de uso oftalmológico devem ser administrados localmente usando dispositivos adequados (Bechara, 1997; Robert, 2000). O colírio atualmente é a formulação mais utilizada. Além disso, sabe-se que a biodisponibilidade ocular de fármacos que penetram na superfície da córnea limita-

se de 1 a 10% da dose, devido à intensa drenagem local proporcionado pelo ato de piscar e pela remoção do fármaco pelo fluido lacrimal (Callegan, 1995). A dosagem através de colírios é inconsistente e de difícil regulação. Portanto, a biodisponibilidade de fármacos oftálmicos poderia ser melhorada baseando-se em sistemas de liberação de fármacos por meio de lentes de contato gelatinosas.

IV . 4-) Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CDs) são carboidratos complexos compostos de unidades de glicose (α -D-glicopirranose) unidas por ligações tipo α -1,4, com estrutura semelhante a um tronco de cone (Britto et al., 2004). Por modificação enzimática é possível obter a ciclização de seis (Alfa Ciclodextrina - α CD), sete (Beta Ciclodextrina - β CD) ou oito (Gama Ciclodextrina - γ CD) unidades de glicose (Venturini et al., 2008) (Figura 4).

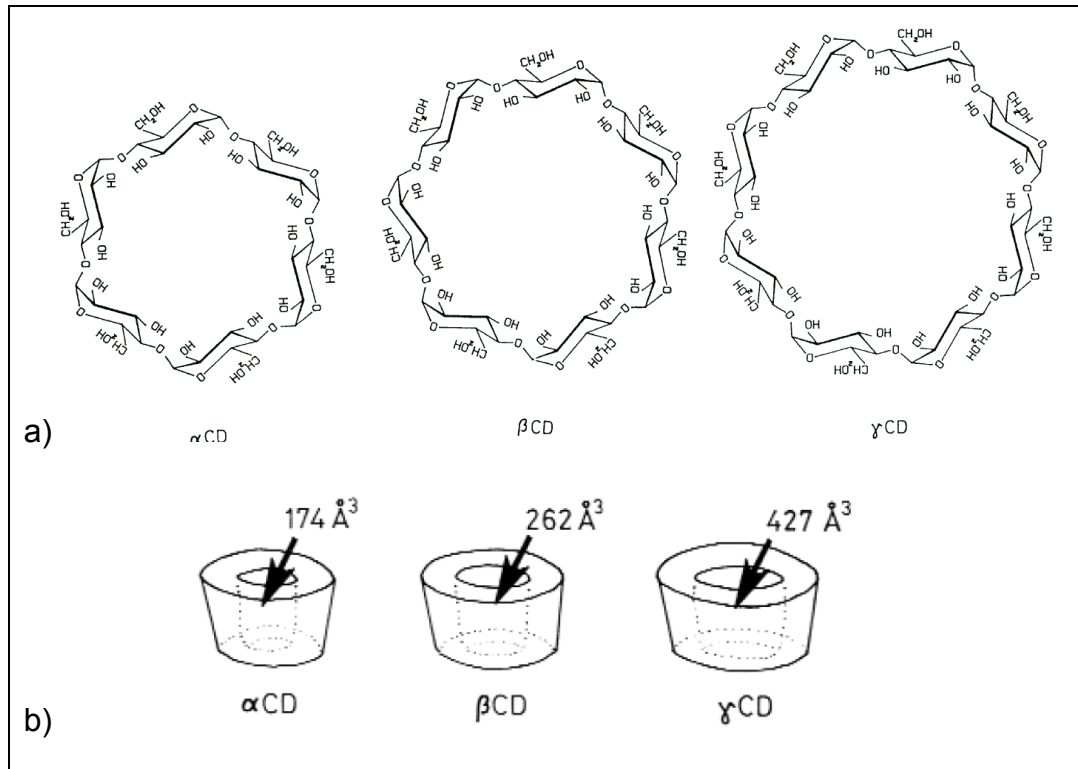


Figura 4 Estrutura (a) e respectivos volumes da cavidade interna (b) das ciclodextrinas (estruturas α , β e γ). Fonte : http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322005000300002&script=sci_arttext#fig03

Atualmente, são encontradas inúmeras aplicações para as CDs na indústria de agroquímicos, fragrâncias, alimentícia, farmacêutica, entre outras. Uma das propriedades mais importantes das CDs é a sua capacidade de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas hóspedes como fármacos. As CDs agem principalmente como veículos de solubilização destes em água, porque as substâncias apolares estão no interior do cone, e a interação com a água ocorre com a parte polar, que fica no exterior do tronco (Loftsson e Masson, 2001) (Figura 5).

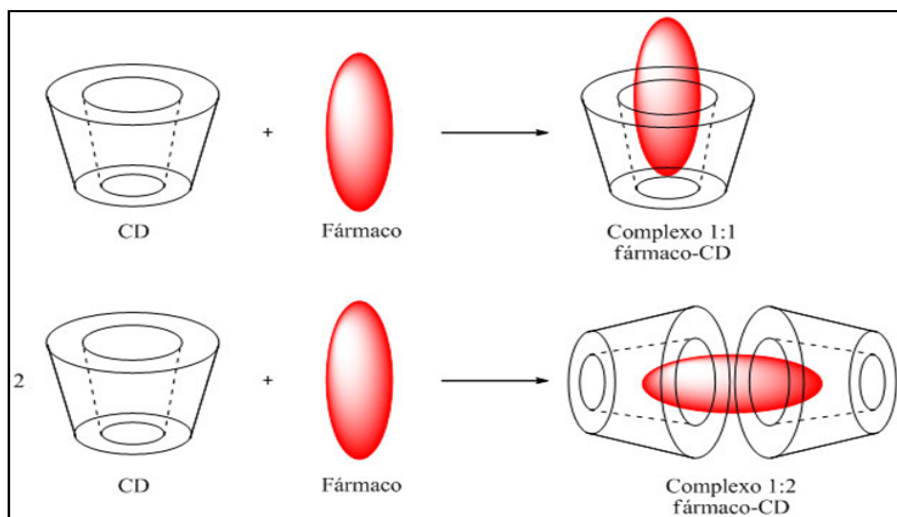


Figura 5: Complexos fármaco-ciclodextrinas.

Fonte: http://www.portaldosfarmacos.ccs.ufrj.br/resenhas_ciclodextrinas.html

As CDs vêm desempenhando um importante papel na Química Medicinal no que diz respeito à tecnologia de liberação controlada de fármacos, que representa atualmente uma das fronteiras da ciência envolvendo diferentes aspectos multidisciplinares do conhecimento. Os sistemas de liberação, freqüentemente descritos como “drug delivery systems”, oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional.

Na indústria farmacêutica, as CDs são utilizadas principalmente para melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade do princípio ativo e as suas propriedades organolépticas, diminuindo o cheiro e o sabor desagradáveis de alguns fármacos, transformando compostos líquidos em sólidos, diminuindo a volatilidade e evitando incompatibilidades indesejáveis. As CDs vêm sendo empregadas com sucesso na administração e liberação de fármacos por várias vias e/ou locais de administração, como oral, vaginal, retal, nasal, oftálmica, pulmonar, dérmica e transdérmica.

Foi proposto o desenvolvimento de uma LCT à base de CB contendo CD e fármacos (diclofenaco de sódio e ciprofloxacino) incorporados.

Os fármacos acoplados à CD são um agente antimicrobiano e/ou um anti-inflamatório. Como agente antimicrobiano será utilizada o CP, um antibiótico de segunda geração da família das quinolonas, de largo espectro, e utilizado na forma colírio aplicado sobre córneas abrasionadas ou em tratamentos oftálmicos como ceratite, conjuntivite ou endoftalmite (Hui et al., 2008). Como agente anti-inflamatório será utilizado o DS. A agregação de do DS aos sistemas de liberação controlada objetiva facilitar e manter uma contínua interação fármaco-córnea, auxiliando na eficácia e biodisponibilidade do medicamento nos processos inflamatórios teciduais.

IV. 5-) Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

De acordo com Widu et al. 1999, os biomateriais devem apresentar algumas características: ter um comportamento mecânico adequado à função que desempenha, ser inerte do ponto de vista químico e biocompatível com o organismo. De uma forma resumida, pode definir-se um biomaterial compatível como aquele que não influencia negativamente o seu ambiente biológico, ou seja, não deverão ser observadas reações tóxicas, alérgicas ou carcinogênicas. As propriedades físicas do material não deverão ser afetadas durante a sua utilização *in vivo*. No intuito de verificar se os materiais apresentam essas propriedades, serão realizados ensaios *in vitro* para investigação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Em todos os ensaios, foi utilizada as células CHO-K1 (células de ovário de hamster chinês).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (Internacional Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos

médicos. Estes ensaios consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes vitais (Guess et al. 1965; Cruz et al. 1987; Ciapetti et al. 1996; Rogero et al. 2000, 2003).

A determinação da citotoxicidade pode ser realizada por meio de uma avaliação qualitativa ou quantitativa. A avaliação qualitativa é realizada pelo exame microscópico das células para verificação de mudanças na morfologia geral. Na avaliação quantitativa o número de células, quantidade de proteínas, liberação de enzimas, liberação ou redução de corante vital podem ser quantificados por espectrofotometria. Um bom método para avaliação de citotoxicidade é por meio do kit XTT, o qual quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente na mitocôndria de converter o sal tetrazólico hidrossolúvel XTT (cor amarela) em compostos de formazana (cor laranja) (Figura 6) por meio de quantificação em espectrofotômetro (Mendonça et al., 2012).

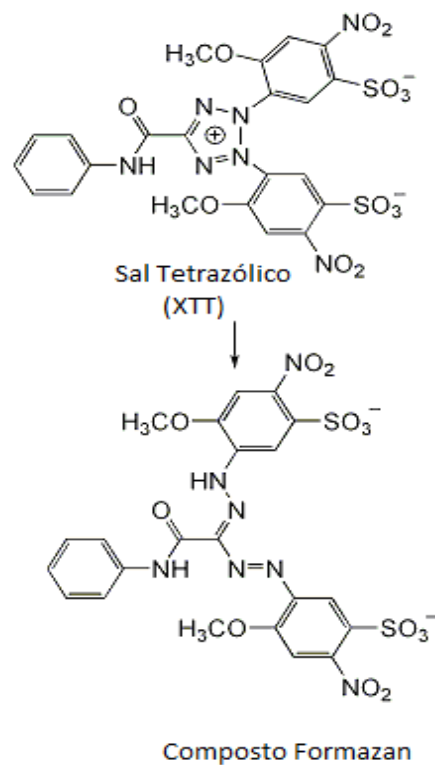


Figura 6: conversão do sal tetrazólico hidrossolúvel XTT (cor amarela) em compostos formazan (cor laranja). Fonte : https://www.biosynth.com/index.asp?topic_id=214&g=19&m=285

Outro método, também quantitativo, seria o Ensaio de Sobrevivência Clonogênica, que permite a avaliação da capacidade das células formarem colônias. Esse ensaio detecta as células que mantêm a capacidade de gerar um número considerável de células filhas após um tratamento que induz morte associada à divisão celular (Franken et al., 2006).

Genotoxicidade é definida como o potencial que uma substância tem de reagir com o DNA da célula. Isso pode ocasionar quebras de fita simples e/ou dupla do DNA, que, caso sejam reparadas por enzimas endógenas de reparo do DNA, diz-se que a substância que gerou tais alterações no DNA tem efeito genotóxico. Caso as alterações no DNA de uma célula não sejam passíveis de reparação, elas são

transmitidas de modo estável às células filhas no processo de divisão celular, assim, a substância que causou esse efeito é chamada mutagênica (Gontijo e Tice, 2003).

Testes de curta duração são amplamente utilizados na detecção de agentes mutagênicos (Kuroda et al., 1992). Dentre esses testes, destacam-se a cultura de células de mamíferos *in vitro*, como a cultura de linfócitos de sangue periférico humano, as linhagens celulares provenientes de hamster Chinês, como por exemplo, as células CHO (células de ovário de hamster chinês) e células V79 (fibroblastos de pulmão) (Takahashi, 2003). A linhagem celular CHO tem sido amplamente usada para estudos que avaliam citotoxicidade e genotoxicidade à drogas (Yalkinoglu et al., 1990), além disso, a utilização dessa linhagem é recomendada pela OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*, 2004).

O Ensaio Cometa ou *single cell gel assay* é um excelente método para investigar se um material pode apresentar atividade genotóxica em um tecido e foi descrito por Singh et al., 1988. Posteriormente, sofreu pequenas modificações (Tice et al., 2000), e vêm sendo amplamente utilizado para detecção de dano no DNA. O parâmetro de análise que o teste fornece é a quebra de fitas simples e duplas de DNA, onde os segmentos gerados migram do núcleo, de acordo com o dano ocorrido na molécula. O uso desse ensaio tem sido proposto devido à sua alta sensibilidade quando comparado com outros testes de genotoxicidade (Lemos et al., 2005).

O estudo do dano genético ao nível cromossômico é essencial para a genética toxicológica, pois as mutações cromossômicas são um importante evento da carcinogênese (Poersch, 2005). Entre os métodos mais utilizados para avaliar danos cromossômicos, destaca-se o teste do micronúcleo, que é um núcleo adicional, separado do núcleo principal de uma célula, formado durante a divisão

celular por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que se atrasam em relação aos demais. Resulta de alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou experimentalmente induzidas, ou ainda, de falhas no fuso celular, sendo, portanto, excluído do novo núcleo, formado na telófase (Ramirez, 2000). O teste do micronúcleo com citocalasina B é atualmente utilizado em estudos *in vivo* (monitoramento genotóxico de populações), *in vitro* (avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos e seus possíveis mecanismos de ação) e *ex-vivo* (radiossensibilidade individual) (Salvadori et al., 2003).

VI-) OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver lentes de contato de celulose bacteriana com ciclodextrinas, ciprofloxacino e diclofenaco de sódio incorporados e a avaliação *in vitro* de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das mesmas.

VII-) MATERIAL E MÉTODOS

VII. 1-) Produção da CB

A produção de CB, sintetizada pela bactéria *Acetobacter xylinum*, ocorreu em meio de cultura apresentando a seguinte composição básica: glicose 50 g/L (m/v), extrato de levedura 4 g/L, fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) 2 g/L, sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,73 g/L e etanol 20 g/L a 28°C.

Pré-inóculo: 10% do *Acetobacter xylinum* e 90% do meio foram inoculados, sempre flambando os frascos, e incubados a 28°C por 24 horas.

Inoculação: O pré-inóculo foi utilizado na inoculação dos meios e 100 mL foram adicionados em placas de petri de 13 cm de diâmetro e incubados por 5 dias a 28°C para a produção da celulose.

Após esse período, as membranas de CB produzidas foram lavadas inicialmente com água corrente (3 dias), tratadas com NaOH 0,1M a 80°C por 30 minutos. Depois a solução de NaOH foi trocada e deixada por mais 30 minutos. Na sequência as membranas foram lavadas com água destilada por 3 dias, até verificação de pH neutro.

VII. 2-) Preparo das soluções de CD e fármacos

Para fins de se determinar a dose terapêutica de fármaco na CB, estabeleceu-se que cada mL de uma solução de colírio comercial corresponde a um cm² na membrana de CB seca. Portanto, se a dose terapêutica de DS em um colírio comercial é de 1 mg/mL, adota-se 1,0 mg/cm² para a membrana. No caso do colírio de CP a dose terapêutica é de 3,5 mg/mL. Área dos discos de CB (média de 13,0 cm de diâmetro):

$$\Rightarrow A = \pi \cdot R^2 = \pi \cdot (6,5)^2 = 132,72 \text{ cm}^2$$

Como os discos foram divididos na metade, a área a ser considerada foi de 66,36 cm².

A partir deste valor de área, calculou-se as massas de fármacos e CDs a serem adicionados às membranas.

No entanto, testes iniciais de impregnação do fármaco na membrana de celulose foram realizados e observou-se que, na concentração de 1mg/mL (DS) e 3,5 mg/mL (CP), partículas visíveis de fármacos se depositam sobre a superfície da

membrana, o que não é desejável. A partir deste teste, decidiu-se por diminuir as massas adicionadas pela metade, ou seja, 0,5 mg/cm² (DS) e 1,75 mg/mL (CP).

Na Tabela 1 estão apresentadas as massas adicionadas à área de 66,36 cm².

Tabela 1: relação das massas de fármaco e/ou CD a serem incorporados.

Tipo de membrana	Massa (g)		
	<i>HP-γ-CD (hidroxipropil-γ-ciclodextrina)</i>	<i>Diclofenaco de sódio</i>	<i>Cloridrato de ciprofloxacino</i>
CB + DS	-	0,0332	-
CB+CD+DS	0,1648	0,0332	-
CB + CP	-	-	0,1161
CB+CD+CP	0,5538	-	0,1161
CB+CD	0,5538	-	-

As massas de CD adicionadas foram calculadas considerando-se a proporção molar 1:1 entre a CD e o fármaco.

Os 6 discos de CB foram pesados e a massa média foi calculada (40,09g). Utilizou-se este valor para definir o volume da solução de fármaco a ser adicionado a cada membrana.

Considerando-se que a CB é composta de 99% de água, retirou-se 1/3 da massa da membrana através de enxugamento com papel absorvente e, em seguida, colocou-se a membrana em uma placa contendo a solução com as massas correspondentes de fármaco e/ou CD. O volume desta solução foi considerado como sendo o correspondente a 25% da massa média das membranas, ou seja, 10,0225 mL. O volume de solução adicionado deve ser menor do que o volume retirado da

membrana, pois a membrana não absorve totalmente o volume que foi retirado inicialmente.

Antes do experimento final, foram realizadas algumas tentativas de incorporação utilizando-se este volume de solução de fármaco. Porém, verificou-se que ainda era muito alto para que a membrana pudesse absorver por completo toda a solução do fármaco. Os melhores resultados de dissolução (através de percepção visual) foram com 3mL de solução. Esse volume foi o menor volume possível observado em que ocorreu dissolução.

As massas de cloridrato de ciprofloxacino foram pesadas no escuro, pois esse reagente se degrada com a luz.

As soluções dos fármacos foram deixadas sob agitação por aproximadamente 12 horas e as soluções de cloridrato de ciprofloxacino foram cobertas com papel alumínio para evitar degradação.

VII. 3-) Incorporação da CD e dos fármacos à CB

A incorporação da CD e dos fármacos CP e DS (com e sem CD) à membrana de celulose bacteriana foi realizada através da difusão de um determinado volume das soluções das drogas e da CD em uma membrana de CB úmida. A membrana de CB úmida contém 99% de água e retém esta água em sua rede de fibras nanométricas. Por isso, optou-se por retirar 1/3 da sua massa através da absorção com papel absorvente limpo. Em seguida, a membrana foi colocada em uma placa de petri contendo a solução de fármaco e/ou CD preparada anteriormente. As placas foram tampadas e vedadas para evitar evaporação e deixadas em repouso por 12 horas para que houvesse difusão homogênea dessas soluções na CB. As placas

com cloridrato de ciprofloxacino foram recobertas com papel alumínio para evitar a degradação pela luz. Após esse tempo foram deixadas em estufa ventilada a 37° C, para secagem completa.

VII. 4-) Corte da CB funcionalizada em formato adequado para realização dos testes

Após a secagem, as membranas foram cortadas em formato esférico de 7mm de diâmetro, através de um cortador manual (Figura 7). Foram então encaminhadas para esterilização na empresa Embrarad. A radiação gama utilizada foi de 15 kGY.

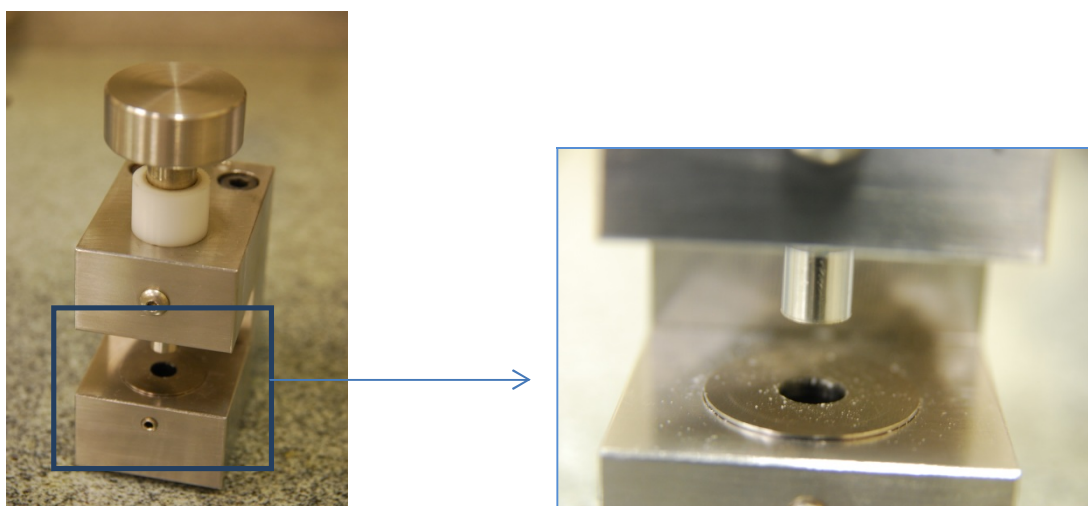


Figura 7 :Cortador manual das membranas utilizado para a obtenção das esferas de 7 mm.

VII. 5-) Construção das curvas padrão e de liberação do DS da lente de CB

VII. 5. 1-) Curva Padrão

A partir dos valores de absorvância (ABS) e fluorescência obtidos na curva padrão dos fármacos, podemos fazer uma relação com a curva de liberação para

saber qual concentração de fármaco está sendo liberado em um determinado tempo.

Todos os gráficos obtidos foram construídos utilizando o programa OriginPro 8.

Para a construção da curva padrão do DS foi utilizado o aparelho Cary Scan UV-VIS-NIR Spectrophotometer do Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, para se obter as leituras de absorbâncias. As leituras foram realizadas em 280nm. Como branco foi utilizado PBS com pH = 7,4 e a partir da concentração do DS de 1mg/mL, foram feitas diluições seriadas nas seguintes proporções:

Tabela 2: Valores para construção da curva padrão do DS.

Amostra	Massa de DS (mg)	Volume de tampão PBS (mL)
1	1	1,0
2	1	1,5 (foi adicionado 0,5 mL na amostra anterior assim que a leitura de absorbância foi medida)
3	1	2,0mL de PBS (foi adicionado 0,5 mL na amostra anterior assim que a leitura de absorbância foi medida)
4	1	2,5mL de PBS (foi adicionado 0,5 mL na amostra anterior assim que a leitura de absorbância foi medida)
5	1	3,0mL de PBS (foi adicionado 0,5 mL na amostra anterior assim que a leitura de absorbância foi medida)

Cada amostra foi deixada em agitador por aproximadamente 1 minuto assim que preparada, antes da leitura ser feita. E cada amostra foi sendo obtida a partir da adição de 0,5 mL de PBS à amostra anterior.

Para construção da curva padrão, os valores das concentrações em mg/mL foram transformados em mol/L da seguinte maneira: $M = m/MM \times V$

Onde M = massa molar (mol/L)

m = massa (g)

MM = massa molecular (g/mol)

V = volume (L)

A partir dos valores obtidos, foi construído o gráfico correspondente à curva padrão do DS (Figura 8).

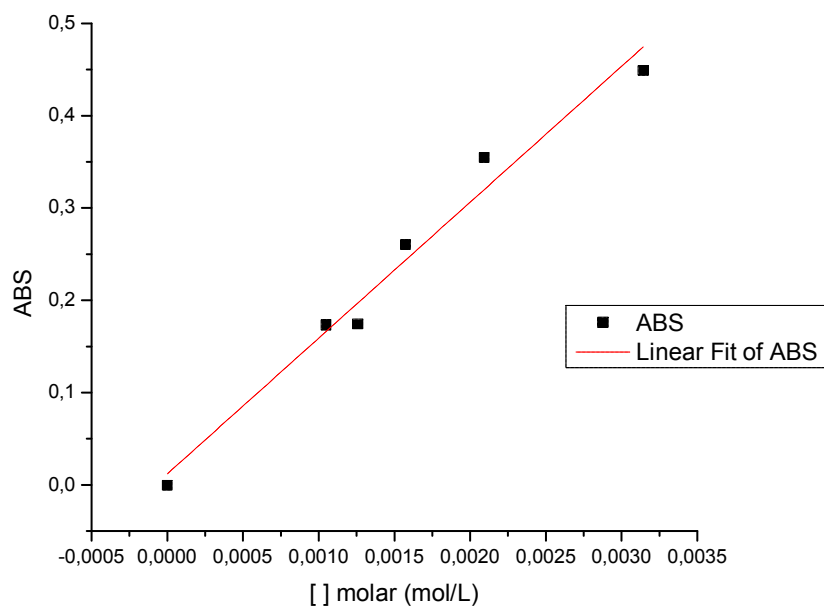


Figura 8 : Gráfico da curva padrão do DS.

A partir do gráfico foi obtida a seguinte equação da reta ($y = ax + b$):
 $y(\text{Abs}) = 0,01183x([\text{] molar (mol/L)}) + 147,24633.$

VII. 5. 2-) Curva de Liberação

Para a realização da medida da quantidade de fármaco liberado, as amostras foram avaliadas em triplicata. Para tanto, cada amostra foi imersa em 10mL de tampão PBS, deixadas sob agitação a 37°C, e foram sendo retiradas alíquotas de 0,5mL para serem medidas as absorbâncias equivalentes nos seguintes intervalos de tempo (em minutos): 1; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 120; 180; 240; 300 e 360.

Os valores das concentrações em mol/L foram obtidos pela substituição do valor da média da triplicata das absorbâncias medidas nos intervalos de tempo na equação da reta da curva padrão: $y(\text{Abs}) = 0,01183x([\text{ } \text{mol/L}) + 147,24633$.

A partir desses valores foram obtidos os valores em mol/10mL, através da multiplicação da concentração em mol/L por 0,01.

Para a construção dos gráficos de tempo x massa de DS liberado, a concentração em mol/10mL foi transformada para massa(g) a partir da fórmula : $n = m/MM$. Onde n é o número de mols, m = massa (g) e MM é a massa molecular do DS. Sendo assim, a massa em cada intervalo de tempo corresponde a mol/10mL . 318,130 g.

VII. 6-) Construção das curvas padrão e de liberação do CP da lente de CB

VII. 6. 1-) Curva Padrão

Para a construção da curva padrão do CP foi utilizado o aparelho Cary Eclipse VARIAN do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, para se obter as leituras de fluorescência. As leituras foram realizadas com comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) em 280nm e de emissão (λ_{em}) em 450nm para o CP.

Como branco foi utilizado PBS com pH = 7,4 e a partir da concentração do CP de 3,5mg/mL, foram feitas diluições seriadas nas seguintes proporções:

Tabela 3: Valores para construção da curva padrão do CP

Amostra	Massa de CP (mg)	Volume de tampão PBS (mL)
1	1	1,0
2	1	1,5 (foi adicionado 0,5 mL na amostra anterior assim que a leitura de absorbância foi medida)
3	1	2,0mL de PBS (foi adicionado 0,5 mL na amostra anterior assim que a leitura de absorbância foi medida)
4	1	2,5mL de PBS (foi adicionado 0,5 mL na amostra anterior assim que a leitura de absorbância foi medida)

Cada amostra foi deixada em agitador por aproximadamente 1 minuto assim que preparada, antes da leitura ser feita. E cada amostra foi sendo obtida a partir da adição de 0,5 mL de PBS à amostra anterior.

Para construção da curva padrão, os valores das concentrações em mg/mL foram transformados em mol/L da mesma maneira que para a curva padrão do DS.

A partir dos valores obtidos, foi construído o gráfico correspondente à curva padrão do CP (Figura 9).

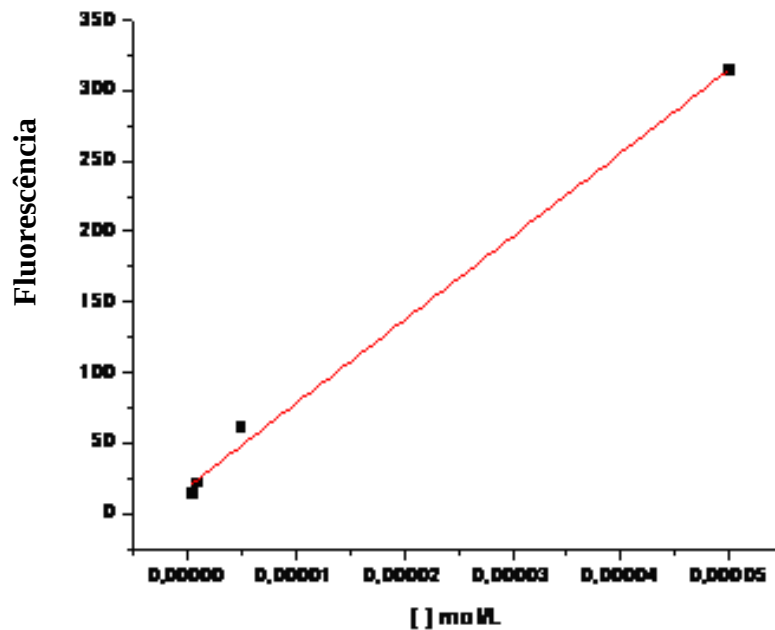


Figura 9 : Gráfico da curva padrão do CP.

A partir do gráfico foi obtida a seguinte equação da reta ($y = ax + b$):
 $y(\text{Abs}) = 18,5505x([\text{] mol/L}) + 5,9335$.

VII. 6. 2-) Curva de Liberação

Para a realização da medida da quantidade de fármaco liberado, as amostras foram avaliadas em triplicata. Para tanto, cada amostra foi imersa em 30mL de tampão PBS sob agitação a 37°C, e a este frasco foi acoplada uma mangueira ligada a uma bomba peristáltica. Desta forma, a bomba faz circular o fluxo da solução de PBS. Esta mangueira, por sua vez, está conectada à cubeta do fluorímetro para a realização da medida de fluorescência do composto em estudo. Um software ligado ao fluorímetro realiza as medições da fluorescência a cada intervalo de tempo pré-determinado

As medidas foram tomadas nos seguintes intervalos de tempo (em minutos): 1; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 120; 180; 240; 300; 360; 420; 480; 540; 600; 660; 720; 780; 840; 900; 960; 1020; 1080; 1140; 1200; 1260; 1320; 1380 e 1440.

Os valores das concentrações em mol/L foram obtidos pela substituição do valor da média da triplicata das absorbâncias medidas nos intervalos de tempo na equação da reta da curva padrão: $y(\text{Abs}) = 18,5505x([\text{ } \text{mol/L}) + 5,9335$.

A partir desses valores foram obtidos os valores em mol/30mL, através da multiplicação da concentração em mol/L por 0,01.

Para a construção dos gráficos de tempo x massa de CP liberado, a concentração em mol/10mL foi transformada para massa (g) a partir da fórmula: $n = m/MM$. Onde n é o número de mols, m = massa (g) e MM é a massa molecular do ciprofloxacino. Sendo assim, a massa em cada intervalo de tempo corresponde a mol/10mL . 331,34g.

VII. 7-)Teste de Citotoxicidade

VII. 7. 1-) Kit – XTT (Roche Molecular Biochemicals)

Esse teste é baseado na clivagem do sal tetrazolium (sodium 3'- [1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) para formar um corante formazan alaranjado. Porém, esta conversão ocorre apenas em células viáveis, devido à atividade de desidrogenases mitocondriais. Assim, a quantidade de células viáveis correlaciona-se diretamente com a quantidade de formazan formado, que é solúvel em solução aquosa e pode ser diretamente quantificado usando um espectrofotômetro.

Foram semeadas 20.000 (2×10^4) células CHO-K1 em placas de 24 poços num volume de 1 mL de meio HAM-F10:D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (1:1) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Foram realizados os tratamentos por 24h colocando-se metade de um disco de 7 mm de diâmetro de cada biomaterial em cada poço, além do controle negativo (CN = sem biomaterial).

Foram testados para escolha do melhor Controle Positivo :

- Cloridrato de doxorrubicina (Doxo) (3,0 µg/mL por 24 horas);
- Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (80 µM por 10 min).

Todos os tratamentos, o CN, a Doxo e o H₂O₂ foram realizados em duplicata. Após o tempo de incubação, os biomateriais foram removidos de cada poço, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1x, e com a câmara de fluxo com a luz apagada, foi colocado em cada poço 1,0 mL de meio DMEN sem fenol vermelho (CULTILAB) com 60µl da solução XTT/electron na proporção de 5000 µL:100µL por poço (concentração final de 0,3mg/ml), deixado a 37°C na estufa por 3 horas. Em seguida, foi feita a leitura colorimétrica em espectrofotômetro a 492 nm normalizada a 690 nm. A absorbância obtida costuma ser proporcional ao número de células viáveis na amostra.

VII. 7. 2-) Sobrevivência Clonogênica

Para o ensaio de sobrevivência clonogênica, foram semeadas 27×10^3 células CHO-K1 em 1 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB, que foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. Foram realizados os tratamentos por 24h colocando-se metade de um disco em cada poço em duplicata, além do CN (sem membrana). Os Controles Positivos utilizados foram: Cloridrato de

doxorrubicina (0,3 µg/mL por 6 horas) e Peróxido de Hidrogênio (80 µM por 10 minutos).

Ao final do tratamento, as membranas e o meio de cultura foram removidos de cada poço, que foram lavados com 1 mL de PBS 1x. Em seguida, as células foram desprendidas por tripsinização, sendo transferidas para um microtubo, num volume de 1 mL de meio de cultura para contagem em Câmara de *Neubauer*. Assim, para o ensaio de sobrevivência clonogênica 150 células foram semeadas em cada frasco de cultivo (25 cm²) com 5 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB, em duplicada por tipo de membrana, além dos controles negativo e positivo. As culturas foram observadas diariamente com o auxílio de um microscópio invertido, e após 7 dias de cultivo, as células foram lavadas com 5ml de PBS 1X a 37°C. Foi descartado o PBS 1X e as células foram fixadas com metanol: ácido acético:água destilada (1:1:8) a 37°C, por 30 minutos. As colônias foram coradas com 5 mL do corante Giemsa diluído em tampão fosfato a 37°C, na proporção de 1:20, por 15 a 30 minutos. Depois de coradas, as células foram lavadas com água destilada, para remover o excesso de corante.

Foram contadas as colônias visíveis a olho nú. O número de colônias contadas no grupo CN foi considerado como 100%. A partir disso, foram realizados os cálculos das frações de sobrevivência (FS):

$$FS = \frac{\text{nº de colônias contadas em cada tratamento} \times 100}{\text{nº de colônias observadas no controle}}$$

VII. 8-) Teste de Genotoxicidade

Foi utilizada a versão alcalina do Ensaio Cometa segundo a metodologia descrita por Singh et al. (1988).

Foram semeadas 2×10^5 células CHO-K1 em 500 microlitros de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB em placa de 24 poços, que foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas. No segundo dia foram realizados os tratamentos colocando-se metade de um disco em cada poço em duplicata, além do CN (sem membrana). Os Controles Positivos utilizados foram: Cloridrato de doxorrubicina (0,3 µg/mL por 4 horas) e Peróxido de Hidrogênio (80 µM por 10 minutos).

Ao final do tratamento, as membranas foram removidas com uma pinça e o meio de cultura retirado de cada poço foi colocado em um respectivo microtubo. As células foram lavadas com 300 µL de Hanks 1x e esse conteúdo também foi colocado no microtubo. Em seguida, as células foram desprendidas por tripsinização e então transferidas para o mesmo microtubo, junto com os conteúdos anteriores e eles foram então centrifugados por 3 minutos a 2000 rpm. Após centrifugação da suspensão celular, o *pellet* de células foi homogeneizado com 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão em volume suficiente para 200 µL. Tal material foi igualmente dividido e aplicado em 2 lâminas histológicas pré-geleificadas com 1,5% de agarose normal. Em seguida, foram cobertas com lamínulas e deixadas na geladeira por 15 minutos; quando após cuidadosa retirada da lamínula, as lâminas foram colocadas em uma solução de lise por pelo menos 12 horas protegidas da luz em geladeira. Da mesma forma, as lâminas foram transferidas para um recipiente contendo tampão de eletroforese alcalino (pH 10) por 20 min para desnaturação do DNA. Em seguida, as

lâminas foram transferidas para uma cuba de eletroforese sendo cobertas com tampão de eletroforese alcalino (pH 10) para corrida a 25V e 300 mA por 25 minutos. Ao final, as lâminas foram transferidas para um recipiente contendo tampão de neutralização (Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, protegidas da luz em geladeira. Após secagem das lâminas à temperatura ambiente, as mesmas foram fixadas em etanol absoluto.

A análise foi feita em microscópio de fluorescência após coloração da lâmina com 80 µL de solução de Brometo de Etídeo (0,2M). Foram fotografados 100 nucleóides por lâmina e posteriormente essas fotos foram analisadas pelo software Comet Score, obtendo-se a porcentagem de DNA na cauda (quantidade de DNA fragmentado, que compõe a cauda). O gráfico obtido foi confeccionado utilizando o programa GraphPad Prism.

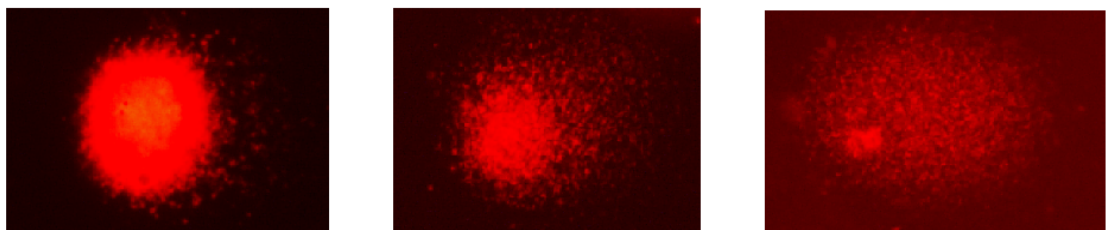


Figura 10 : Exemplos de diferentes intensidades de danos causados às células.

VII. 9-) Teste de Mutagenicidade

Foi adotado o protocolo da GE Healthcare (2006) com algumas adaptações. A partir da terceira passagem de células CHO-K1, $1,5 \times 10^4$ células foram subcultivadas em cada poço de uma placa de cultivo com 96 poços, sendo que para cada material e controles foram destinados 5 poços. No dia seguinte, procederam-se os tratamentos com os biomateriais. Foram realizados os tratamentos por 24h

colocando-se uma membrana (1/5) em cada poço, além do controle negativo (sem membrana). O Controle Positivo constou de cloridrato de doxorubicina (0,3 µg/mL por 4 horas). Após o cultivo de 24 horas, foram adicionados 1,3 µl de citocalasina B (1mg/mL) em cada poço da placa de cultivo celular para interromper a citocinese.

Lavou-se novamente com PBS 1X e adicionaram-se os corantes Hoechst e DAPI diluídos em PBS 1X (0,3 µl de cada um por poço). Deixou-se por 30 minutos e então analisaram-se os resultados no equipamento IN Cell Analyzer 1000 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara - UNESP.

Para a determinação do Índice de Divisão Nuclear (IDN), 1000 células foram contadas por poço, anotando-se as células que continham de 1 a 4 núcleos.

O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989) utilizando a fórmula:

$$IDN = \frac{[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]}{N}$$

Onde M1 a M4 é o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente; e N é o número total de células viáveis.

Além disso, também foram contadas as células que apresentavam micronúcleos dentre 1000 células binucleadas (Figura 11), e assim, foi estimada a frequência de micronúcleos. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleos foram baseados em Fenech (2000).

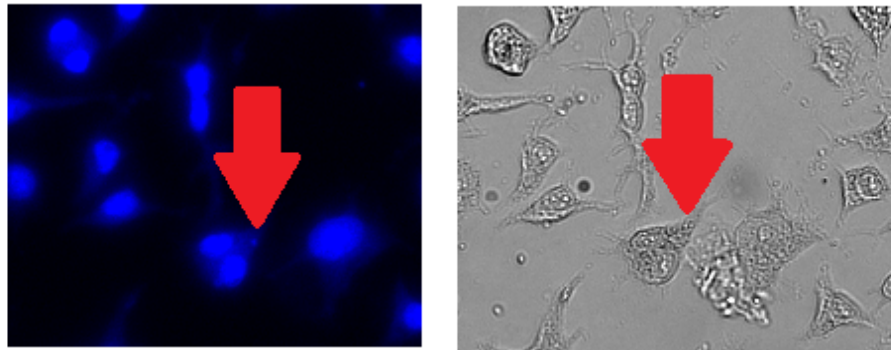


Figura 11: A seta mostra uma célula binucleada com um micronúcleo. Do lado direito está a imagem do campo claro, evidenciando um único citoplasma que comporta os dois núcleos e o micronúcleo.

Análise Estatística

Para cada tratamento foram calculadas a média, o desvio-padrão e o erro padrão como medidas de variabilidade. Para avaliar se os dados obedeciam à distribuição normal foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Os dados variaram entre paramétricos (apresentando aderência à curva normal) e não-paramétricos. Assim, para os paramétricos foram aplicadas a análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de Tukey. Também foi aplicado o teste de Dunnet, que compara os valores obtidos de cada um dos tratamentos com o de uma referência (no caso, o Controle Negativo). Para dados não-paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls. Foi utilizado o programa BioEstat 5.0 e todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%.

VIII-) RESULTADOS

VIII. 1-) Curvas de liberação do DS

A Figura 12 apresenta o gráfico contendo as curvas de liberação de DS *versus* tempo para as amostras das lentes de CB-DS.

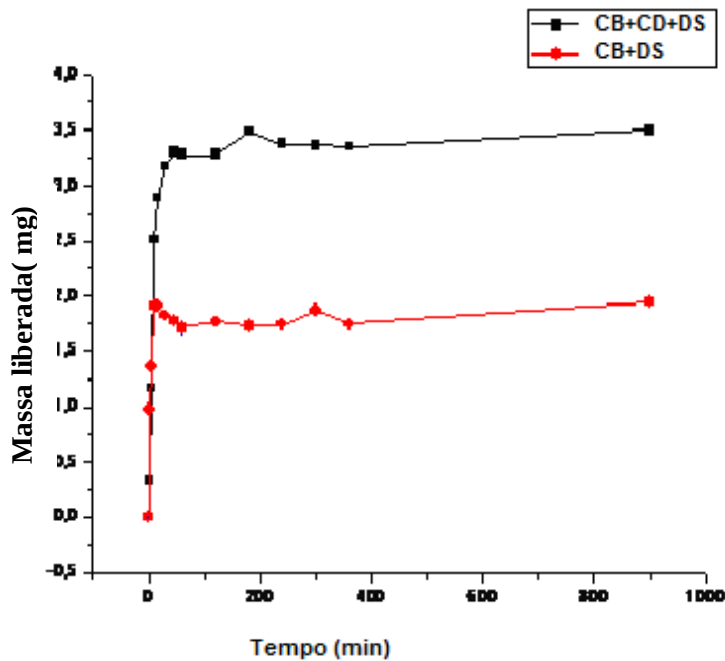


Figura 12: Gráfico das curvas de liberação de DS para as amostras CB+DS (celulose bacteriana + diclofenaco de sódio) e CB+CD+DS (celulose bacteriana+hidroxipropil- γ -ciclodextrina+ diclofenaco de sódio).

Diminuindo-se a escala de tempo do gráfico anterior para até 150 minutos, obtemos o gráfico da Figura 13.

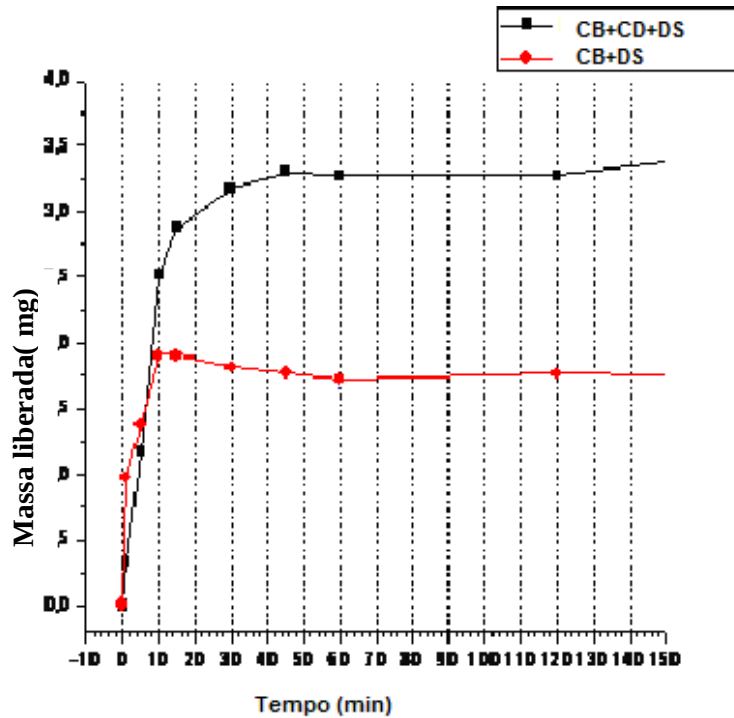


Figura 13: Gráfico com diminuição da escala de tempo do gráfico da Figura 12.

Podemos observar que na presença da CD, o fármaco é liberado de maneira mais lenta. Do disco sem CD foi liberado aproximadamente 2mg do fármaco em 10 minutos e a partir disso foi atingido o patamar de concentração. Quanto ao disco com CD, foi liberado aproximadamente 3mg do fármaco em 45 minutos até atingir a constante.

VIII. 2-) Curvas de liberação do CP

O gráfico contendo as curvas de liberação do CP *versus* tempo para as amostras das lentes de CB-CP está plotado a seguir:

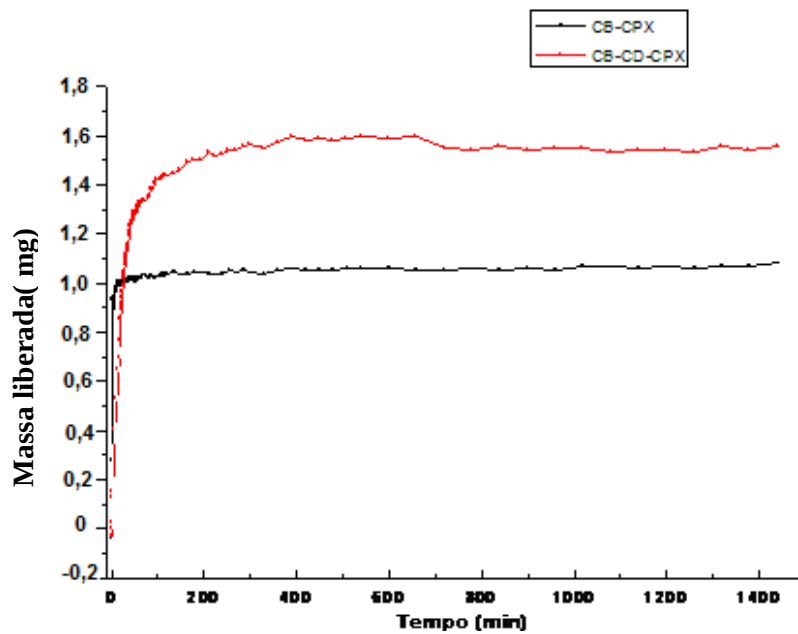


Figura 14: Gráfico das curvas de liberação de CP para as amostras CB+CP (celulose bacteriana + cloridrato de ciprofloxacino) e CB+CD+CP (celulose bacteriana+hidroxipropil- γ -ciclodextrina+ cloridrato de ciprofloxacino).

Diminuindo-se a escala de tempo do gráfico anterior para até 180 minutos, obtemos o gráfico da Figura 15.

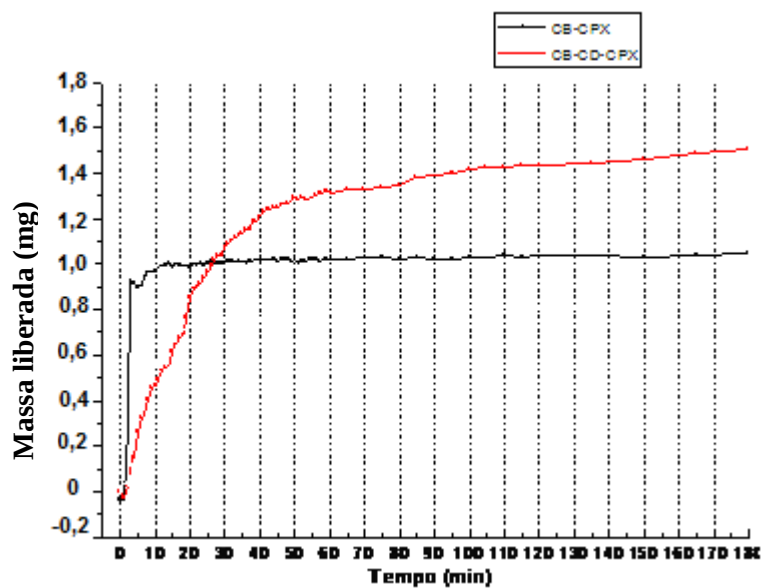


Figura 15: Diminuição da escala de tempo do gráfico da figura 12.

Assim como com o DS, é possível observar uma liberação mais lenta do CP da lente quando na presença da CD. É possível visualizar que o CP foi liberado em menos de 20 minutos no disco sem a CD e quando incorporada a CD, ele é liberado gradativamente em até 500 minutos, quando atinge o patamar de concentração máximo.

VIII. 3-) Teste de Citotoxicidade

VIII. 3.1-) Kit – XTT (Roche Molecular Biochemicals)

A análise de citotoxicidade pelo método XTT, demonstrou absorbância estatisticamente diferente ($p < 0,01$) entre o CN (células CHO-K1 sem tratamento com nenhum biomaterial) e as células CHO-K1 tratadas com Doxo, tendo sido assim, escolhido como Controle Positivo. Quanto ao H_2O_2 , também foi observada diferença estatística, mas muito menos significativa que a Doxo.

Considerando a absorbância obtida do CN como valor referência, os materiais CB, CB-CD-CP e CB-CD mostraram-se significativamente não citotóxicos, pois mostraram absorbância acima daquela obtida para o CN (Figura 16); inclusive esses materiais aumentaram a viabilidade celular em torno de 40% (Figura 17). Por outro lado, os materiais CB-CD-DS, CB-CP e CB-DS, mostraram-se citotóxicos, pois mostraram absorbância significativamente menor que o CN (Figura 16). Com relação ao CP, observou-se que a Doxo teve melhor comportamento que o H_2O_2 , sendo, portanto, escolhida como CP.

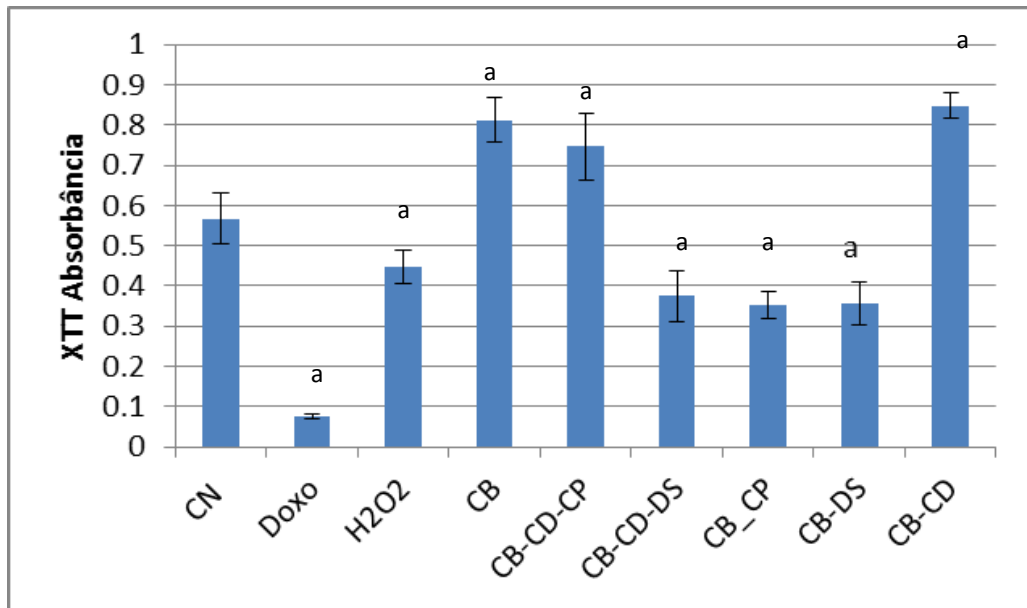


Figura 16: Citotoxicidade avaliada pelo método XTT. Colunas indicam o valor médio da absorbância a 492nm normalizado a 690nm. Barras indicam o erro padrão. Letra minúscula representa diferença estatisticamente significativa ($a = p < 0,01$) em relação ao CN de acordo com os testes de Tukey e de Dunnett.

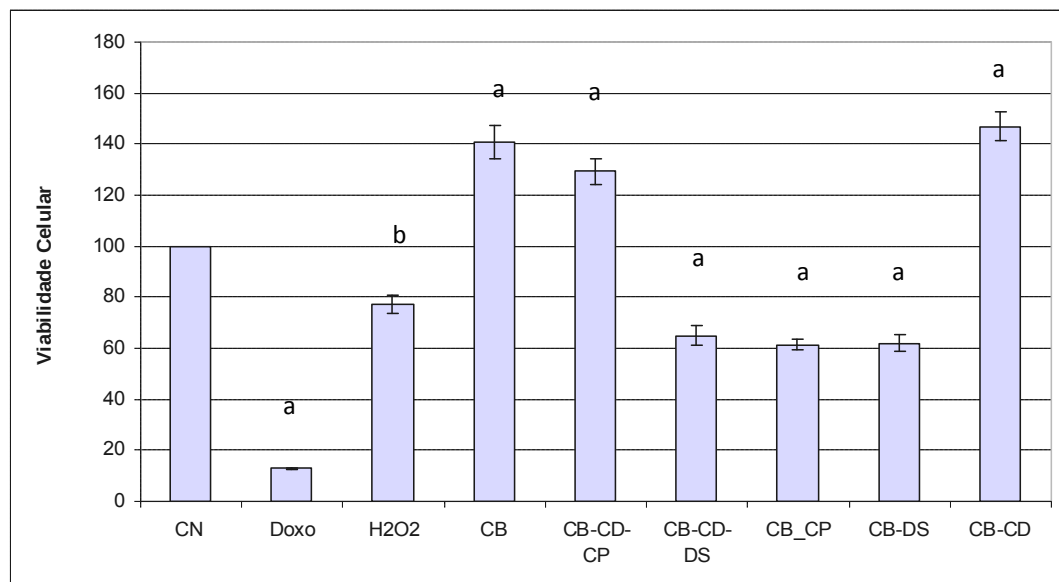


Figura 17: Viabilidade celular avaliada pelo método XTT. CN representa 100% de viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. Letra minúscula representa diferença estatisticamente significativa ($a = p < 0,01$; $b = 0,05$) em relação ao Controle Negativo. Teste de Tukey e Dunnett.

VIII. 3.2-) Sobrevivência Clonogênica

Considerando os resultados da Fração de Sobrevivência, pode-se observar que houve diferença estatística ($p < 0,01$) entre o CN e os dois controles positivos testados, a Doxo e H_2O_2 , mas como a fração de sobrevivência da Doxo foi menor que do H_2O_2 foi considerada como melhor CP. Os materiais CB, CB-CD-CP e CB-CD não mostraram fração de sobrevivência estatisticamente diferente em relação ao CN. Já os materiais CB-CD-DS, CB-CP e CB-DS apresentaram fração de sobrevivência significativamente diferente do CN (Figura 18). Portanto, esses materiais mostraram provocar um comprometimento na capacidade proliferativa das células.

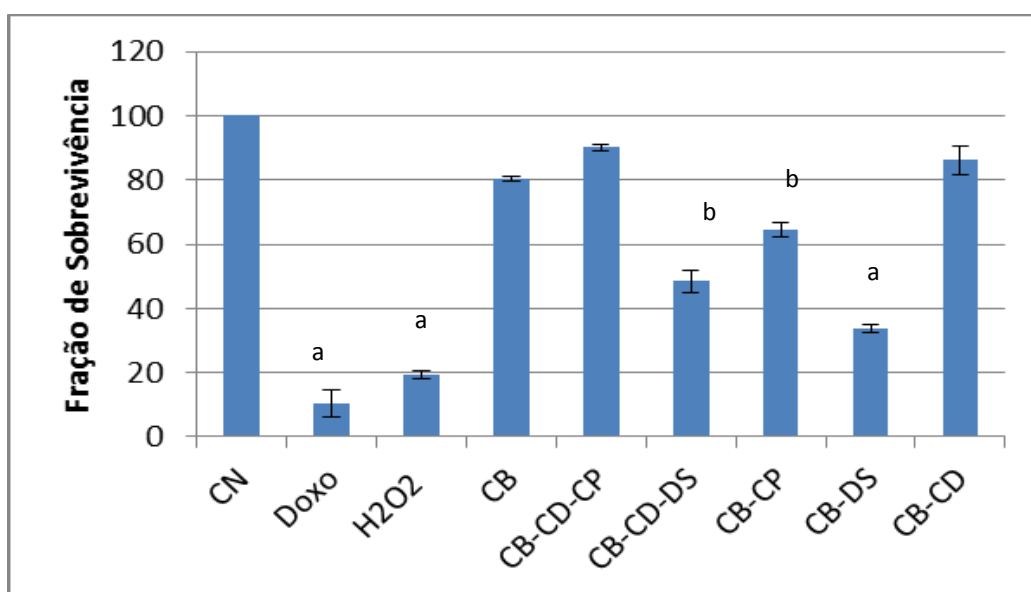


Figura 18. Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. Letra minúscula representa diferença estatisticamente significativa ($a = p < 0,01$; $b = p < 0,05$) em relação ao CN de acordo com o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Analisando conjuntamente os dois testes realizados para investigar a citotoxicidade (XTT e Sobrevivência Clonogênica), pode-se observar concordância

em ambos quanto ao melhor comportamento da Doxo como CP, e que os materiais CB, CB-CD-CP e CB-CD além de não serem citotóxicos, terem maior viabilidade celular (XTT), também não prejudicaram a capacidade proliferativa das células (Sobrevivência Clonogênica). Ao contrário do que foi observado para os materiais CB-CD-DS, CB-CP e CB-DS que além de terem sido citotóxicos (XTT) também comprometeram significativamente a capacidade proliferativa das células (Sobrevivência Clonogênica).

VIII. 4-) Teste de Genotoxicidade

Na análise de genotoxicidade pelo teste do Cometa, os resultados da Porcentagem de DNA na cauda obtidos a partir teste do Cometa indicaram que os Controles Positivos e os materiais CB-DS e CB-CD-DS foram ambos significativamente diferentes do Controle Negativo ($p < 0,01$) de acordo com o teste estatístico de Tukey. Os materiais apresentaram genotoxicidade moderada (**) em comparação aos controles positivos, que apresentaram genotoxicidade elevada (***) de acordo com análise realizada pelo programa GraphPad Prism (Figura 19).

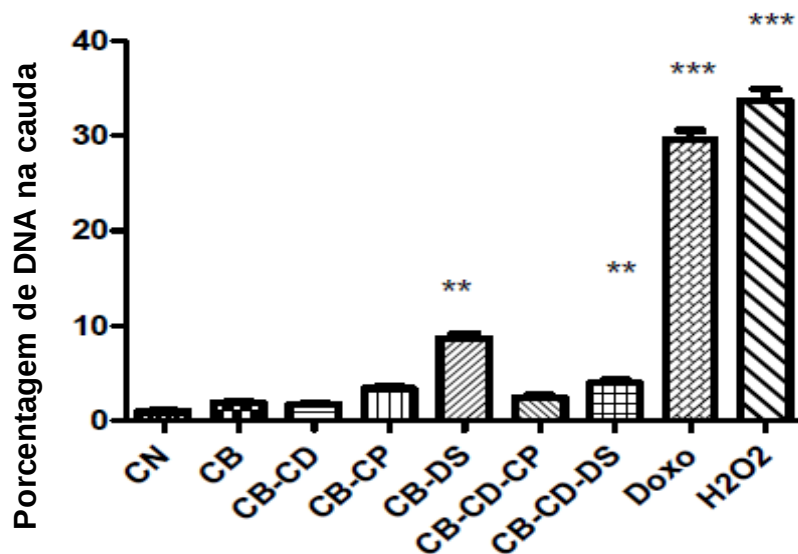


Figura 19: Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio da Porcentagem de DNA na cauda. Barras indicam o erro padrão. Os símbolos (*) representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação ao CN de acordo com o teste de Tukey. A presença de ** indica genotoxicidade moderada (CB-DS e CB-CD-DS) e *** genotoxicidade elevada (Doxo e H_2O_2).

VIII. 5-) Teste de Mutagenicidade

Complementando a análise de genotoxicidade, foram realizados testes de mutagenicidade por meio do ensaio do Micronúcleo, de modo que os resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

Pelo teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, não houve diferença estatisticamente significativa para o Índice de Divisão Nuclear (IDN) entre nenhum dos tratamentos, incluindo os Controles Negativo e Positivo, bem como com os materiais investigados.

Tabela 4: Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Micronucleadas e Frequência de Micronúcleos (FMN) obtidas de cada tratamento com os materiais e controles.

Tratamento	IDN	FCM	FMN
	Média ± Erro Padrão	Média ± Erro Padrão	Média ± Erro Padrão
CN	1,531 ± 0,003	6,333 ± 0,333	6,33 ± 0,33
CP (Doxo)	1,537 ± 0,004	105,0 ± 3,606 ^a	120,33 ± 1,20 ^a
CB	1,565 ± 0,008	7,667 ± 0,667	7,67 ± 0,67
CB-CD	1,539 ± 0,008	12,667 ± 0,667	13,00 ± 1,00
CB-CP	1,528 ± 0,016	12,000 ± 0,577	12,00 ± 0,58
CB-DS	1,539 ± 0,016	31,000 ± 1,528 ^a	31,00 ± 1,53 ^a
CB-CD-CP	1,518 ± 0,010	13,000 ± 0,577	13,00 ± 0,58
CB-CD-DS	1,539 ± 0,015	32,333 ± 0,333 ^a	32,33 ± 0,33 ^a

Letra minúscula sobrescrita: diferença estatística em relação ao CN, $p < 0,01$. Teste de *Kruskall-Wallis*, seguido do pós-teste de *Student-Newman-Keuls*.

Com relação à Frequência de células com micronúcleo (FCM) obtidas de 1000 células binucleadas por experimento, comparativamente ao CN, observou-se um número bastante elevado no CP (Doxo) e nos materiais CB-DS e CB-CD-DS, que foram estatisticamente diferentes do CN ($p < 0,01$), pelo teste de *Kruskall-Wallis*, seguido do pós-teste de *Student-Newman-Keuls*. Resultado idêntico pode ser observado com relação à frequência de micronúcleos (FMN) nas 1000 células binucleadas, reforçando os dados obtidos pelo FCM de que esses são mutagênicos.

IX-) DISCUSSÃO

Ficou evidente que para ambos os fármacos a formação do complexo com a CD retarda sua liberação. Comparativamente, a liberação do DS ocorreu muito mais rapidamente que do CP. Tendo este por isso um maior potencial para substituir tratamentos com colírios durante prazos longos (até mais de 8 horas). Portanto, o poder curativo da CB se juntaria à ação antibacteriana do CP em certos processos, como pós-operatórios oftalmológicos.

Futuramente, poderão ser realizadas modificações nos métodos de crescimento da CB visando modificar as redes fibrosas do material e, desta forma, tentando-se sequestrar fisicamente as moléculas do DS, contribuindo para uma liberação mais lenta.

Quanto à citotoxicidade, em concordância com os resultados do presente estudo por meio dos testes de XTT e a Sobrevivência Clonogênica, estudos anteriores já haviam evidenciado que a CB não é citotóxica (Saska et al., 2012; Caminaga et al., 2010; Moreira et al., 2009). O presente resultado de não citotoxicidade da CB está em concordância também com estudos anteriores que mostram a biocompatibilidade *in vivo* da CB, evidenciada pela ausência de inflamação após aplicação do material em modelo animal por 12 semanas (Helenius et al., 2006) e 12 meses (Pertile et al., 2011).

Observou-se que os materiais contendo CD, aumentaram a viabilidade celular (análise do XTT) e a capacidade proliferativa (análise da Sobrevivência Clonogênica), exceto quando o fármaco DS estava presente. Esse resultado é bastante interessante, pois mostra que a adição de CD não alterou o comportamento não citotóxico da CB. Além disso, notou-se que a adição do fármaco CP à CB-CD, ou seja, o material CB-CD-CP foi a associação que demonstrou maior viabilidade

celular e capacidade proliferativa, comparando-se com as amostras contendo fármacos.

Interessantemente, como mencionado, a CB-CD quando associada ao DS apresentou efeito citotóxico (Figuras 16, 17 e 18). Considerando que o DS associado à CB (CB-DS) também foi citotóxico, acredita-se que isso ocorreu por influência do DS. Estudos futuros poderão investigar se aumentando a concentração da CD, e/ou ajustando a dose de DS esse efeito citotóxico poderia ser anulado.

O ensaio de Sobrevivência Clonogênica realizado para complementar a investigação de possível ação citotóxica dos materiais testados, avaliou se algum deles causaria dano na capacidade das células CHO-K1 de se replicarem mitoticamente. Esse ensaio também é conhecido como Ensaio Clonogênico ou Ensaio de Formação de Colônias e é importante para investigar se uma droga pode ter um efeito de citotoxicidade tardio (long-term cytotoxicity) levando à letalidade celular que teria um efeito dose-dependente (Sumantran et al., 2007). Há a possibilidade de, sob ação de uma substância, uma célula não ter sofrido ação citotóxica imediata, de modo que o método XTT mostrasse a viabilidade celular, mas outros danos poderiam ter ocorrido de modo a comprometer a capacidade proliferativa dessa célula. No caso dos materiais testados nesse estudo, houve concordância dos resultados obtidos da avaliação da citotoxicidade imediata (XTT) e tardia (Sobrevivência Clonogênica).

Em 2010 Kloskowski et al. demonstraram a capacidade citotóxica do ciprofloxacino por meio de ensaios de viabilidade celular a partir de concentrações de 10mg/mL por um período de incubação de 24 horas. Isso também foi evidenciado pelo presente estudo no material CB-CP nos testes de XTT e Sobrevivência Clonogênica.

Castagne et al. (2007) realizaram um estudo de toxicidade em células endoteliais *in vitro* com os diferentes tipos de ciclodextrinas existentes e demonstraram que a HP- γ -CD não apresenta efeito citotóxico em diferentes concentrações até 10mM pelo período de 1 hora de incubação, assim como, o presente estudo também não demonstrou esse efeito.

O efeito citotóxico com inibição da proliferação celular para o diclofenaco de sódio de modo dose dependente foi evidenciada por Takahashi et al. (1993). No presente estudo também foi verificada a citotoxicidade do diclofenaco de sódio por meio dos materiais CB-DS e CB-CD-DS.

Considerando a CB, o presente estudo demonstrou sua não genotoxicidade e não mutagenicidade, em concordância com o estudo anterior de Saska et al. (2012). O efeito não genotóxico da CB foi descrito anteriormente (Schmitt et al., 1991), assim como, o efeito não genotóxico de nanofibras de CB (Moreira et al. 2009). Vale ressaltar que o teste do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas para detectar lesões genômicas que podem tornar-se uma mutação (Gontijo e Tice, 2003). O ensaio do micronúcleo detecta quebras cromossômicas e aneuploidias, lesões drásticas que não podem ser reparadas pela maquinaria celular de reparo do DNA (dos Santos et al., 2007).

A concepção e desenvolvimento de novos biomateriais têm sido de fundamental importância para a indústria, devido às características físico-químicas benéficas que eles oferecem. No entanto, as partículas livres no citoplasma podem ter acesso ao núcleo durante a divisão celular, podendo interagir com o DNA, e assim, serem responsáveis pelos efeitos biológicos adversos, tais como, a genotoxicidade ou mutagenicidade. Alternativamente, os biomateriais podem causar danos ao DNA indiretamente, através da promoção de estresse oxidativo e resposta

inflamatória (Singh et al., 2009). Dada à considerável incerteza sobre a segurança dos materiais, é necessário que nós compreendamos e, posteriormente, minimizemos quaisquer potenciais riscos toxicológicos associados a eles, não só para proteger a saúde humana e o meio ambiente, mas também para evitar danificar a indústria dos biomateriais a longo prazo (Singh et al., 2009).

No entanto, com relação ao DS, o ensaio Cometa evidenciou sua genotoxicidade, representado pelos materiais CB-DS e CB-CD-DS. Esse resultado difere do encontrado por Koga et al. em 2010. Ele realizou o ensaio cometa com alguns antiinflamatórios, dentre eles o diclofenaco de sódio em concentração 0,1mM por 24 horas e não encontrou efeito genotóxico.

Estudos realizados por Ibrulj et al. 2006 demonstraram que a quantidade de micronúcleos em células binucleadas aumenta de acordo com o aumento da dose de DS. O estudo foi realizado *in vitro* com uma linhagem de linfócitos humanos, mas o resultado da análise estatística foi não significativo para o DS em comparação com o controle negativo. Sendo assim, o resultado desse ensaio foi que o DS não apresenta efeito mutagênico, resultado contrário ao do presente estudo. Mas o fato do número de micronúcleos aumentar com a dose deve ser levado em consideração, uma vez que esse número também foi maior no presente estudo com o fármaco DS em relação ao outro fármaco utilizado, o CP.

X-)CONCLUSÃO

Os testes de liberação de fármacos indicaram que a lente de celulose bacteriana contendo DS liberou muito rapidamente este fármaco, mesmo em presença da CD. A partir dos testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foi possível verificar que os materiais CB-DS e CB-CD-DS

apresentaram efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico e isso provavelmente ocorreu pela influência da ação do DS.

Por outro lado, a lente de celulose contendo CP e CD possui uma liberação mais lenta e tem potencial para substituir tratamentos com colírios durante prazos longos (até mais de 8 horas). Portanto, o poder curativo da CB se juntaria à ação antibacteriana do CP em certos processos, como pós-operatórios oftalmológicos. O material CB-CP apresentou citototoxicidade pelos testes do XTT e da Sobrevivência Clonogênica, mas não apresentou efeito genotóxico, nem mutagênico.

Relacionando as liberações com os testes de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade é possível observar que a intensidade de dano gerado às células pode estar relacionada com a velocidade de liberação do fármaco. Quando a liberação é imediata (efeito conhecido como “burst effect”), o patamar de concentração máxima é atingido muito rapidamente e a célula entra em contato com as moléculas do fármaco todas de uma vez, e não de forma gradativa, como ocorre quando a liberação é feita de forma controlada. Esse efeito pode explicar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade encontrada nos materiais com o DS, uma vez que sua liberação ocorreu muito rapidamente no período entre 0 e 10 minutos (Figura 13).

Futuramente, poderão ser realizadas modificações nos métodos de crescimento da CB visando modificar as redes fibrosas do material e, desta forma, tentando-se sequestrar fisicamente as moléculas do DS, contribuindo para uma liberação mais lenta e conseqüentemente para a não observação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos.

XI-) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, F. K.; SILVA, J. P.; CARVALHO, M.; CASTANHEIRA, E. M.; SOARES, R.; GAMA M. Studies on the hemocompatibility of bacterial cellulose. J. Biomed. Mater. Res. A., v.98, n.4, p.554-66, 2011.

ASTLEY, O. M.; CHANLIAUD, E.; DONALD, A. M. E.; GIDLEY, M. J. Structure of Acetobacter cellulose composites in the hydrated state. Int J Biological Macromol., v.29, p.193-202, 2001.

BACKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG B.; GATENHOLM P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. Biomaterials, v.27, n.9, p.2141-9, 2006.

BACKDAHL, H.; ESGUERRA, M.; DELBRO, D.; RISBERG, B. ; GATENHOLM, P.; Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. J Tissue Eng Regen Med, v.2, n.6, p.320-30, 2008.

BARUD, H.S.; ARAUJO, J.; BARRETA, A.M.; ASSUNÇÃO, R.M.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Propolis containing bacterial cellulose membranes. IV International Symposium on non-Crystalline solids; VII Brazilian Symposium on Glass and Related Materials., p.221, 2007.

BARUD H. S.; BARRIOS C. E.; MARQUES R. F. C.; VERELST M.; DEXPERT-GHY J.; MESSADDEQ Y.; RIBEIRO S. J. L. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. Master Sci Eng C., v.28, p.515-8, 2008.

BECHARA, S. J.; KARA, J. N. Lentes de contato terapêuticas. 1ª ed. São Paulo: Roca L, v.1, p.443-8, 1997.

BOONE A.; HEYNEN M.; JOYCE E.; VARIKOOTY J.; JONES L. Ex vivo protein deposition on bi-weekly silicone hydrogel contact lenses. *Optom Vis Sci.*, v.86, p.1241-9, 2009.

BRITTO M. A. F. O.; NASCIEMTNO JR. C. S.; DOS SANTOS H. F. Análise estrutural de ciclodextrinas: um estudo comparativo entre métodos teóricos clássicos e quânticos. *Química Nova*, v.27, p.882-8, 2004.

BROWN, JR. R. M.; WILLISON, J. H. M.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.73, p. 4565-9, 1976.

CALLENGAN, M. C.; HOB DEN, J. A.; OCALLAGHAM, R. J. Ocular drug delivery-a comparison of transcorneal iontophoresis to corneal collagen shields. *Int. J. Pharm.*, v.9, p.123-73, 1995.

CAMINAGA, R. M. S. Investigação da citotoxicidade e genotoxicidade de biomateriais à base de celulose bacteriana: estudo in vitro. Relatório Final de Pesquisa de Pós-Doutoramento, 2010.

CASTAGNE D.; SALEM B.; DELLATRE L.; NUSGENS B.; PIEL G. Effect of cyclodextrins on the viability of endothelial cells. J. incl. Phenom Macrocycl Chem v.57, p.105-7, 2007.

CIAPETTI G.; GRANCHI D.; VERRI E.; SAVARINO L.; CAVEDAGNA D., Pizzoferrato, A. Biomaterials, v.7, p.1259-64, 1996.

CRUZ A. S.; CUPPOLONI K. M.; MARTINEZ C. H. O.; GOMES L. F. S. Rev.Inst.Adolfo Lutz, v. 47, n. 1/2, p. 51-57, 1987.

CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, JR. R. M. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. Biomaterials, v.27, n.2, p.145-51, 2006.

DE SOUZA, F. C.; OLIVAL-COSTA H.; L. DA SILVA, L.; PONTES P. A.; LANCELLOTTI C. L. Bacterial cellulose as laryngeal medialization material: an experimental study. J Voice, v.25, n.6, p.765-9, 2011.

DOS SANTOS R. A.; JORDAO A. A.; VANNUCCHI H.; TAKAHASHI C. S. Protection of doxorubicin-induced DNA damage by sodium selenite and selenomethionine in Wistar rats. Nutr Res, v.27, p.343-348, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. Mut Res, v.455, p.81-95, 2000.

FINK, H.; AHRENSTEDT, L.; BODIN, A.; BRUMER, H.; GATENHOLM, P.; KRETTEK, A.; RISBERG B. Bacterial cellulose modified with xyloglucan bearing the

adhesion peptide RGD promotes endothelial cell adhesion and metabolism--a promising modification for vascular grafts. *J Tissue Eng Regen Med*, v.5, n.6, p.454-63, 2010.

FINK, H.; HONG, J.; DROTZ, K.; RISBERG, B. ; SANCHEZ J.; SELLBORN A. An in vitro study of blood compatibility of vascular grafts made of bacterial cellulose in comparison with conventionally-used graft materials. *J Biomed Mater Res A*, 2011.

FONTANA, J. D.; DE SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DE SOUZA, S. J. ; NARCISCO, G. P.; BICHARA J. A.; FARAH L. F. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*, v.24-25, p.253-64, 1990.

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J. ; VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*, v. 1, n. 5, p. 2315-2319. 2006.

GE HEALTHCARE. Micronucleus formation analysis on the IN Cell Analyzer 1000. Application note 28-4070-46 AA, 2006.

GEYER, U.; HEINZE, T.; KLEMM, D.; MARSCH, S.; SCHUMANN, D.; SCHMAUDER, H. P. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.*, 16, p. 343-347, 1994.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

GUESS W. L.; ROSENBLUTH S. A.; SCHIMIDT B.; AUTIAN J.; J.Pharm Sci, v. 54, p. 1545-1547, 1965.

HELENIUS, G.; BACKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM P.; RISBERG B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. J Biomed. Mater. Res. A., v.76, n.2, p.431-8, 2006.

HIRATANI, H.; ALVAREZ-ALONSO, C. The nature of backbone monomers determines the performance of imprinted soft contact lenses as timolol drug delivery systems. Biomaterials, v.25, p. 1105-1113, 2004.

HUI, Z.; YU, L.; XIAOLI, Y.; XIANG, H.; FAN, Z.; NINGBO, H.; ZHIGANG, Y.; PING, L.; YANHONG, Z.; QINGJUN, M. C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide regulates hematopoiesis in early stage. J. Cell Biochem., v.101, p. 1423-1429, 2008.

IBRULJ S.; HAVERIC A.; HAVERIC S.; RAHMANOVIC A.; MIJANOVIC M. The Cytogenetic Evaluation of Diclofenac Effects on Cultured Human Lymphocytes. Pharmacia v.16, p. 612-615, 2006.

INTERNATIONAL STANDARD: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro meth-<xls. ISO 10993-5, 1992.

JAIN, M. R. Drug delivery through soft contact lenses. Br. J. Ophthalm., v.72, p.150-154, 1988.

KAPOOR, Y.; CHAUHAN, A. Ophthalmic delivery of Cyclosporine A from Brij-97 microemulsion and surfactant-laden p-HEMA hydrogels. Int. J. Pharm., 361, p.222-229, 2008.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT U.; MARSCH S. Bacterial synthesized cellulose- artificial blood vessels for microsurgery. Prog Polym Sci v.26, p.1561-603, 2001.

KLOSKOWSKI T.; OLKOWSKA J.; NAZLICA A.; DREWA T. The Influence of ciprofloxacin on hamster ovarian cancer cell line CHO AA8. Acta Poloniae Pharmaceutica = Drug Research, v. 67, n. 4, p. 345-349, 2010.

KOGA T.; FUJIWARA R.; NAKAJIMA M.; YOKOI T. Toxicological Evaluation of Acyl Glucuronides of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Using Human Embryonic Kidney 293 Cells Stably Expressing Human UDP-Glucuronosyltransferase and Human Hepatocytes. Drug Metabolism & Disposition. 10.1124/dmd.110.035600, 2010.

KURODA, Y.; JAIN, A. K.; TEZUKA, H.; KADA, T. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.*, v.267, p. 201-209, 1992.

LEMOS, N. G.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Evaluation of genotoxic of prozac(flouxetine) without and with addition of vitamins A and C by means of the comet assay in culture of CHO-K1 cells. *Semina: Ciências biológicas e da saúde.*, v. 26, n. 2, p.95-100, 2005.

LOFTSSON, T.; MASSON, M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int. J. Pharm.*, v. 225, 15-30, 2001.

MARK, L.; MACDERMOTT, M. D.; JOHN, W.; CHANDLER, M. D. Therapeutic contact lenses. *Surv Ophthalmol.*, v.33, p. 381-394, 1989.

MENDONÇA, R. H.; COSTA, M. F.; THIRÉ, R. M. S. M. Produção de Arcabouços Tridimensionais Bioativos para Bioengenharia Óssea, Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012.

MOREIRA S.; SILVA N. B.; ALMEIDA J. L.; ROCHA H. A.; MEDEIROS S. R.; ALVES C. JR.; GAMA F.M. BC nanofibres: in vitro study of genotoxicity and cell proliferation. *Toxicol. Lett.*, v.41, p.189:235, 2009.

MORESCHI J. C.; Processos para a obtenção de malhas de microfibrilas de celulose bacteriana para usos médicos e veterinários, e malhas de microfibrilas assim obtidas. RPI 1204, p. 30, 1993.

PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. Tissue Engineering: Prentice Hall, 2003

PERTILE, R. A.; MOREIRA, S.; COSTA, R. M.; CORREIA, A.; GUARDAO, L.; GARTNER, F.; VILANOVA M.; GAMA M. Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies. J Biomater Sci Polym Ed, 2011.

PERTILE, R.; MOREIRA, S.; ANDRADE, F.; DOMINGUES L.; GAMA M. Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. Biotechnol Prog, 2012.

PETERSEN, N.; P. GATENHOLM. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.91, n.5, p.1277-86, 2011.

PINTO-ALPHANDARY, H.; ANDREMONT, A.; COUVREUR, P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. Int J Pharm., v.13, p.155-168, 2000.

POERSCH, A. Atividade protetora da DCTN (trans-desidrocrotonina) na frequência de micronúcleos e apoptose induzidos por diferentes agentes mutagênicos in vitro. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, p. 77, 2005.

RAMBO, C. R. ; RECOUVREUX, D. O. S. ; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K. ; ANTONIO R. V. ; PORTO L. M. Template assisted synthesis of porous

nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. Mat. Sci. Eng. C-Bio. S., v.28, p.549-54, 2008.

RAMIREZ, A. Análise de Células Metanucleadas de Alcoólicos Portadores de Carcinomas Orais. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade de São Paulo, p. 126, 2000.

RECOUVREUX, D. O. S.; RAMBO, C. R. ; BERTI, F. V. ; CRAMINATTI, C. A. ;. ANTÔNIO R. V ; PORTO L. M. Novel threedimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. Materials Science and Engineering C, v.31, n.2, p.151-157, 2011.

REDDY, K.; GANESAN, M. G.Ocular therapeutics and drug delivery: an Overview.Pennsylvania: CRC Press, p.3-29, 1996.

ROBERT, P. Y.; TASSY, A.Bioavailability of antibiotics.J. Fr. Ophtalmol, v.23, p.510-513, 2000.

ROGERO S. O.; SOUZA-BAZZI A.; IKEDA T. I.; CRUZ A. S.; FERNANDES K. C.; HIGA O. Z; Rev.Inst.Adolfo Lutz, v. 59,n. (1/2), p. 1-5, 2000.

ROGERO S. O.; HIGA O. Z.; SAIKI M.; CORREA O. V.; COSTA; I. Toxicology in Vitro, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

SASKA, S.; TEIXEIRA, L. N.; DE OLIVEIRA, P. T.; MINARELLI, A. A. G.; RIBEIRO, S. J. L.; MESSADEQ, Y.; MARCHETTO, R. Bacterial cellulose-collagen nanocomposite for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*; v. 22, n. 41, p. 22102-22112, 2012.

SCHMITT D. F.; FRANKOS V. H.; WESTLAND J.; ZOETIS T. Toxicologic evaluation of Cellulon(TM) fiber: genotoxicity, pyrogenicity, acute and subchronic toxicity. *J Am Coll Toxicol*; v.10, p.541–54, 1991.

SINGH N. P.; MCCOY M. T.; TICE R. R.; SCHNEIDER. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, v.175, p. 184-191, 1988.

SINGH N.; MANSHIAN B.; JENKINS G. J. S.; GRIFFITHS S. M.; WILLIAMS P. M.; MAFFEIS T. G. G.; WRIGHT C. J.; DOAK S. H. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials* v.30, p.3891-3914, 2009.

SOBRINHO A. G. Uma película celolósica no tratamento de queimaduras de I e II graus . *Ver. Bras. Cir.* v.7, p.45-51, 1989.

SUMANTRAN, V. N.; BODUL, S.; KOPPIKAR, S. J.; DALVI, M.; WELE, A.; GAIRE, V.; WAGH, U. V. Differential growth inhibitory effects of *W. somnifera* root and *E. officinalis* fruits on CHO cells. *Phytother Res.*, v.21, p.496-499, 2007.

SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTBERG M.; GATENHOLM P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, v.26, n.4, p.419-31. 2005.

TAKAHASHI N.; MIYAKOSH M.; TAKA N.; KURIHARA T.; FUJIKAWA K. Cytotoxic effects of diclofenac sodium. *Feb.*, v.97, p.145-149, 1993.

TAKAHASHI, C. S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (eds) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA. p.151-172, 2003.

TICE, R. R; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASASAKI, Y. F. The single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 35, p.206–221, 2000.

VALLA, S.; COUCHERON, D. H.; FJAERVIK, E.; KJOSBAKKEN, J.; WEINHOUSE, H.; ROSS, P. Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulose-negative mutant by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Mol. Gen Genet.*, v.217, p. 26–30, 1989.

VENTURINI C. G.; NICOLINI J.; MACHADO C.; MACHADO V. G. Propriedades e Aplicações Recentes das Ciclodextrinas. *Química Nova*, v. 31, n. 2, p.360-368, 2008.

VIEIRA J. C.; BADIN A. Z. D.; CALOMENO L. H. A.; TEIXEIRA V.; OTTOBONI E.; BAILAK M.; SALLES JR G. Membrana porosa de celulose no tratamento de queimaduras. Arquivos Catarinenses de Medicina, v.36, s.1, 2007.

XINMING, L.; YINGDER, C.; LLOYD, A. W.; MIKHALOVSKY, S. V.; SANDERMAN, S. R.; HOWEL, C. A.; LIEWEN, L. Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: A review. Contact Lens & Anterior Eye., v.1, p.57-63, 2008.

WATANABE, K.; ETO, Y.; TAKANO, S.; NAKAMORI, S.; SHIBAI H.; YAMANAKA S. A new bacterial cellulose substrate for mammalian cell culture. A new bacterial cellulose substrate. Cytotechnology, v.13, n.2, p.107-14, 1993.

WIDU, F.; DRESCHER D.; JUNKER R.; BOURAUUEL C.; Journal Mater. Science Mater. Med., v.10, p 272-275, 1999

ZABOROWSKA, M. A.; BODIN, H.; BACKDAHL, J.; POPP, A. GOLDSTEIN and P. GATENHOLM. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. Acta Biomater, v.6, n.7, p.2540-7, 2010.

ZAHEDMANESH, H.; MACKLE, J. N.; SELLBORN, A.; DROTZ, K.; BODIN, A.; GATENHOLM P.; LALLY C. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, v.97, n.1, p.105-13, 2011.

YALKINOGLU, A. O.; SCHLEHOFER, J. R.; ZUR-HAUSEN, H. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced methotrexate and adriamycin resistance in CHO cells by adeno-associated virus type 2. *Int. J. Cancer*, v.45, p. 1195-1203, 1990.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.