

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Biocompatibilidade da membrana de celulose
bacteriana no subcutâneo, intramuscular e
intraperitoneal – Estudo experimental em ratos
Wistar.**

CAROLINE FANCELI GONÇALVES PASCOTO

BOTUCATU – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Biocompatibilidade da membrana de celulose
bacteriana no subcutâneo, intramuscular e
intraperitoneal – Estudo experimental em ratos
Wistar.**

CAROLINE FANCELI GONÇALVES PASCOTO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – UNESP, Campus de
Botucatu - SP, para obtenção do título de mestre
em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Patologia Animal

Orientador: Alexandre Hataka

BOTUCATU – SP

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pascoto, Caroline Fanceli Gonçalves.

Biocompatibilidade da membrana de celulose bacteriana no subcutâneo, intramuscular e intraperitoneal : estudo experimental em ratos Wistar / Caroline Fanceli Gonçalves Pascoto. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Alexandre Hataka

Capes: 50503006

1. Biocompatibilidade. 2. Peritônio. 3. Cavidade peritoneal. 4. Tegumento comum. 5. Ratos Wistar.

Palavras-chave: Biocompatibilidade; Cavidade intraperitoneal; Intramuscular; Membrana de celulose bacteriana; Subcutâneo.

Nome do autor: CAROLINE FANCELI GONÇALVES PASCOTO

Título: Biocompatibilidade da membrana de celulose bacteriana no subcutâneo, intramuscular e intraperitoneal – Estudo experimental em ratos Wistar.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Alexandre Hataka
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Assoc. Luciana Pinato
Membro
FFC – UNESP – Marília

Profa. Assoc. Renée Laufer Amorim
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 05 de maio de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** pela dádiva da vida, por ter me mostrado o amor pelos animais ainda na infância, o que me motivou escolher a medicina veterinária como profissão, por ter me capacitado ao longo desses anos e pela realização pessoal e profissional.

Ao meu marido **Rogério**, por todo seu amor, incentivo, companheirismo, sempre me apoiando em todas minhas decisões e por ser o meu porto seguro.

Aos meus filhos amados, **Sofia**, **Arthur** e **Helena**, por extraírem o melhor de mim, por serem inspiração de seres humanos repletos de luz, carinho e compreensão.

Aos meus pais **Maurício** e **Sueli** pelo apoio incondicional e por estarem presentes em todos os momentos.

Ao meu orientador **Alessandre Hataka**, por todos ensinamentos, orientação, pela oportunidade que me proporcionou de ingressar na área acadêmica e confiança em mim depositada.

À professora **Angela Faustino Jozala**, pela produção e disponibilização das membranas, material fundamental para que a pesquisa fosse realizada.

À professora **Luciana Pinato**, por ceder o laboratório e o biotério para execução da pesquisa.

À professora **Maria Angélica Spadella**, por ceder os equipamentos para leitura das lâminas, que facilitou a finalização dos resultados.

Aos técnicos de laboratórios, **Augusto Santana Nascimento** do Laboratório de Neurociência da Unesp de Marília, pela ajuda com o manejo e organização com os animais no biotério e preparo dos materiais para as cirurgias; e a **Rosa** do Laboratório de Embriologia da Famema, por solucionar dúvidas com os equipamentos, sempre com paciência e doçura.

À estagiária **Isabela Leite Doretto**, pela parceria, amizade e auxílio com a pesquisa.

À **CAPES** pela bolsa concedida, a qual viabilizou a realização desse projeto.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados da reação biológica com relação a presença e tipo da reação inflamatória e presença de células gigantes mononucleadas, neovascularização e tecido conjuntivo ao redor da membrana de celulose bacteriana implantada no subcutâneo, nos diferentes momentos.....21

TABELA 2 - Correlação entre a presença de reação inflamatória crônica versus a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana no subcutâneo.....21

TABELA 3 - Resultados da reação biológica com relação a presença e tipo da reação inflamatória e presença de células gigantes mononucleadas, neovascularização e tecido conjuntivo ao redor da membrana de celulose bacteriana implantada intramuscular, nos diferentes momentos.....22

TABELA 4 - Correlação entre a presença de reação inflamatória crônica versus a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana no intramuscular.....22

TABELA 5 - Resultados da reação biológica com relação a presença e tipo da reação inflamatória e presença de células gigantes mononucleadas, neovascularização e tecido conjuntivo ao redor da membrana de celulose bacteriana implantada intraperitôneo, nos diferentes momentos.....22

TABELA 6 - Correlação entre a presença de reação inflamatória crônica versus a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana no intraperitônio.....23

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fotomicrografia das alterações histopatológicas aos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do implante da membrana de celulose bacteriana. (A) Discreta inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho, notar célula gigante na seta; (B) Presença moderada de células gigantes; (C) Moderada neovascularização; (D) Moderada inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho; (E) Presença intensa de células gigantes; (F) Discreta neovascularização; (G) Intensa inflamação piogranulomatosa; (H) Presença intensa de células gigantes; (I) Discreta cápsula de tecido conjuntivo ao redor da membrana. Hematoxilina e Eosina, 40x.....23

FIGURA 2 - Histoquímica – Fotomicrografia do subcutâneo. Tricrômico de Masson, notar as fibras de colágeno ao redor da nanomembrana coradas em azul. Reticulina, notar a presença de delicadas fibras reticulares coradas em negro na interface entre a membrana e o peritônio. Pricosirius Red sob luz polarizada, notar colágeno tipo I (vermelho) e colágeno tipo III (verde). Objetiva de 40x.....25

FIGURA 3 - Histoquímica – Fotomicrografia intramuscular. Objetiva de 40x.....26

FIGURA 4 - Histoquímica – Fotomicrografia intraperitoneal. Objetiva de 40x.....27

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Membrana de Celulose Bacteriana.....	12
2.2 Lesões nos animais domésticos.....	12
2.3 Utilização da membrana de celulose bacteriana como dispositivo médico.....	13
3 TRABALHO CIENTÍFICO.....	13
4 CONCLUSÕES GERAIS	29
5 BIBLIOGRAFIA.....	30

RESUMO

PASCOTO, C.F.G. Biocompatibilidade da membrana de celulose bacteriana no subcutâneo, intramuscular ou intraperitoneal – Estudo experimental em ratos Wistar. Botucatu, 2021. 36p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, membrana de celulose bacteriana, subcutâneo, intramuscular, intraperitoneal, cavidade peritoneal.

A biocompatibilidade da membrana de celulose bacteriana foi estudada *in vivo* para estabelecer protocolos e desenvolvimento de dispositivos médicos viáveis para o uso clínico-cirúrgico. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento da membrana de celulose bacteriana implantada no subcutâneo (SC), intramuscular (IM) e intraperitoneal (IP) de ratos Wistar. Cento e cinco ratos Wistar adultos foram divididos em três grupos experimentais de acordo com o tempo de coleta da amostra, sendo 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. Análises histológicas e histoquímicas foram realizadas. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado, e $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Aos 15 dias de pós-operatório, no SC e IP estavam presentes fibras colágenas tipo III de aspecto espesso e desorganizado na periferia da membrana, enquanto no IM havia predominância do tipo I com mesmo aspecto, e aos 30 e 60 dias, houve predomínio do tipo I, e o colágeno se apresentou mais organizado em todos os sítios. Observou-se presença de arranjo de delicadas fibras de reticulina com discretas ramificações adentrando a membrana aos 15 dias, tornando-se mais organizada e retilínea aos 60 dias. O processo inflamatório, células gigantes, neovascularização e discreta cápsula de tecido conjuntivo estiveram presentes em todos os grupos e em todos os tempos experimentais. Concluiu-se que apesar da promissora aplicação da membrana de celulose bacteriana na cicatrização de tecidos moles, ela não apresentou biocompatibilidade no tempo estudado.

ABSTRACT

PASCOTO, C.F.G. Biocompatibility of bacterial cellulose membrane in the subcutaneous, intramuscular or intraperitoneal - Experimental study in Wistar rats. Botucatu, 2021. 36p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The biocompatibility of bacterial cellulose membrane was studied *in vivo* to establish protocols and development of viable medical devices for clinical-surgical use. This study aimed to evaluate the behavior of bacterial cellulose membrane implanted in the subcutaneous (SC), intramuscular (IM) and intraperitoneal (IP) of Wistar rats. One hundred and five adult Wistar rats were divided into three experimental groups according to the sample collection time, 15, 30 and 60 days after surgery. Histological and histochemical analyzes were performed. Quantitative data were submitted to the Chi-Square test, and $p \leq 0.05$ was considered significant. At 15 days after the operation, type III collagen fibers with a thick and disorganized aspect were present in the SC and PI, while in the IM there was a predominance of type I with the same aspect, and at 30 and 60 days, there was a predominance of type I, and collagen was more organized in all sites. It was observed the presence of an arrangement of delicate reticulin fibers with discrete ramifications entering the membrane at 15 days, becoming more organized and straight after 60 days. The inflammatory process, giant cells, neovascularization and discrete connective tissue capsule were present in all groups and at all experimental times. It was concluded that despite the promising application of bacterial cellulose membrane in soft tissue healing, it did not show biocompatibility during the time studied.

Keywords: Biocompatibility, bacterial cellulose membrane, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, peritoneal cavity.

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais são definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos, podendo ser de origem sintética ou natural (PIRES *et al.*, 2015).

Dentre os biomateriais utilizados, uma série de estudos destacou o uso da membrana de celulose bacteriana como um dispositivo médico por inúmeras vantagens em sua aplicação (ALMEIDA *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2019; VIELREICHER *et al.*, 2018; ZHARIKOV *et al.*, 2018). Essas membranas são indicadas nos casos de defeitos, escassez de tecidos e como suporte temporário, promovendo regeneração e cicatrização tecidual (FU *et al.*, 2013, TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Para aplicação desses biomateriais é necessário o conhecimento das características e propriedades do produto implantado, já que muitos cirurgiões defendem e utilizam os implantes quando há escassez de tecido, porém o uso ainda é restrito e poucos são os trabalhos que avaliam a biocompatibilidade (FARNESI BASSI *et al.*, 2020).

Úlceras de pele, neoplasias, queimaduras e grandes feridas, geralmente resultam em danos extensos às camadas de pele. Assim como, a reparação cirúrgica dos tecidos que compõe a parede abdominal que é uma necessidade frequente nos animais (ZHARIKOV *et al.*, 2018), principalmente pela presença de hérnias traumáticas associadas a quedas, chutes ou atropelamentos; podemos evidenciar uma grande ruptura na região, muitas vezes sem possibilidade de síntese por aproximação simples das bordas (FOSSUM, 2014).

Considerando-se a importância do uso das membranas de celulose bacteriana, a caracterização da resposta inflamatória da membrana de celulose bacteriana implantada pode auxiliar no entendimento do comportamento desse biomaterial, para que possa atuar

como um dispositivo médico, a fim de auxiliar na regeneração ou construção de um novo tecido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.4 Membrana de Celulose Bacteriana (MCB)

A MCB consiste em um biofilme translúcido e gelatinoso, formado por nanofibras (diâmetro da fibra: 20–100 nm) de celulose, entrelaçadas, distribuídas em direções aleatórias, que contém 99% de água em sua composição. Esse polímero natural é biossintetizado extracelularmente pelas culturas bacterianas Gram-negativas de *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Sarcina*, *Azobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Alcaligenes* (FU *et al.*, 2013). Entre eles, o produtor da MCB mais eficiente são as bactérias do ácido acético pertencentes ao gênero *Gluconacetobacter*, mais especificamente *G. xylinus*. Essas bactérias são amplamente disseminadas na natureza e têm a capacidade de formar celulose polimérica natural em nanoescala (KESHK, 2014; KLEMM *et al.*, 2011).

A MCB apresenta inúmeras vantagens quando comparada com a celulose vegetal: é mecânica e fisicamente mais resistente, possui morfologias diferentes (biomimética de colágeno), é pura (livre de lignina e hemicelulose), pode ser moldada durante o cultivo, possui elevado grau de cristalinidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, quando devidamente processada. Essas características fazem do material um insumo interessante para aplicação nas áreas de medicina, veterinária, farmácia, cosmética e nas indústrias alimentícia, têxtil e de eletrônicos (OSORIO *et al.*, 2017; DOURADO *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2018).

2.5 Lesões nos animais domésticos

A ampla aplicação e importância da MCB são descritas pela utilização em reparos de defeitos da parede abdominal que resultam de traumas, infecções, neoplasias ou deformidades. Auxilia no processo de cicatrização de pele nos casos de queimaduras, feridas e úlceras, acelerando o processo de epitelização, evitando a desidratação da ferida. Também há relatos com resultados satisfatórios em regeneração osso-cartilagem; aplicação dentária; lentes intraoculares; dispositivo de assistência ventricular (LVAD) e diversas doenças, tais como câncer; . (PREVEL *et al.*, 1995; PICHETH *et al.*, 2017; HALIB *et al.*, 2017; VAN LOEY & VAN SON, 2003).

2.6 Utilização da membrana de celulose bacteriana como dispositivo médico

A utilização da MCB na parede abdominal previne a eventração; incorpora o remanescente da parede abdominal; promove suporte muscular dinâmico e a aproximação livre de tensão; e também, assegura que a parede reconstruída tenha sua força aumentada ao longo do tempo (DIBELLO & MOORE, 1996).

O uso em curativos de feridas e transplante de pele, devido a sua nanoestrutura, alto teor de água, conformabilidade e propriedades elásticas dessa membrana, permite um alto grau de aderência aos locais da ferida, evita a desidratação e promove a cicatrização do tecido epitelial mais rápido (FU *et al.*, 2013).

3. TRABALHO CIENTÍFICO

ARTIGO PARA JOURNAL APPLIED MATERIALS TODAY

**Biocompatibilidade da membrana de celulose bacteriana no subcutâneo,
intramuscular ou intraperitoneal – Estudo experimental em ratos Wistar.**

**Biocompatibility of bacterial cellulose membrane in the subcutaneous,
intramuscular or intraperitoneal - Experimental study in Wistar rats.**

Caroline Fanceli Gonçalves Pascoto¹ ORCID: 0000-0003-2470-06

Isabela Leite Doretto¹ ORCID: 0000-0002-9457-7948

Miriam Harumi Tsunemi⁴ ORCID: 0000-0002-9585-4230

Luciana Pinato² ORCID: 0000-0001-7788-9205

Angela Faustino Jozala³ ORCID: 0000-0002-3763-5451

Alessandre Hataka¹ ORCID: 0000-0002-2023-212X

Palavras-chave: Biocompatibilidade, membrana de celulose bacteriana, subcutâneo, intramuscular, intraperitoneal, cavidade peritoneal.

A biocompatibilidade da membrana de celulose bacteriana foi estudada *in vivo* para estabelecer protocolos e desenvolvimento de dispositivos médicos viáveis para o uso clínico-cirúrgico. O presente estudo teve como objetivo avaliar o comportamento da membrana de celulose bacteriana implantada no subcutâneo (SC), intramuscular (IM) e intraperitoneal (IP) de ratos Wistar. Cento e cinco ratos Wistar adultos foram divididos em três grupos experimentais de acordo com o tempo de coleta da amostra, sendo 15, 30 e 60 dias de pós-operatório. Análises histológicas e histoquímicas foram realizadas. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de Qui-Quadrado, e $p < 0,05$ foi considerado significativo. Aos 15 dias de pós-operatório, no SC e IP estavam presentes fibras colágenas tipo III de aspecto espesso e desorganizado na periferia da membrana, enquanto no IM havia predominância do tipo I com mesmo aspecto, e aos 30 e 60 dias,

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu/ UNESP. ² Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília/ UNESP ³ LAPETOX Uniso Sorocaba. ⁴ Instituto de Biociências de Botucatu/ UNESP, e-mail para correspondência: caroline.fanceli@unesp.br.¹

houve predomínio do tipo I, e o colágeno se apresentou mais organizado em todos os sítios. Observou-se presença de arranjo de delicadas fibras de reticulina com discretas ramificações adentrando a membrana aos 15 dias, tornando-se mais organizada e retilínea aos 60 dias. O processo inflamatório, células gigantes, neovascularização e discreta cápsula de tecido conjuntivo estiveram presentes em todos os grupos e em todos os tempos experimentais. Concluiu-se que apesar da promissora aplicação da membrana de celulose bacteriana na cicatrização de tecidos moles, ela não apresentou biocompatibilidade no tempo estudado.

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais são definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos, podendo ser de origem sintética ou natural (PIRES *et al.*, 2015).

Dentre os biomateriais utilizados, uma série de estudos destacou o uso da membrana de celulose bacteriana (MCB) como um dispositivo médico por inúmeras vantagens em sua aplicação (ALMEIDA *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2019; VIELREICHER *et al.*, 2018; ZHARIKOV *et al.*, 2018). Essas membranas são indicadas nos casos de defeitos, escassez de tecidos e como suporte temporário, promovendo regeneração e cicatrização tecidual (FU *et al.*, 2013, TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Para aplicação desses biomateriais é necessário o conhecimento das características e propriedades do produto implantado, já que muitos cirurgiões defendem e utilizam os implantes quando há escassez de tecido, porém o uso ainda é restrito e poucos são os trabalhos que avaliam a biocompatibilidade (FARNESI BASSI *et al.*, 2020).

Úlceras de pele, neoplasias, queimaduras e grandes feridas, geralmente resultam em danos extensos às camadas de pele. Assim como, a reparação cirúrgica dos tecidos que compõe a parede abdominal que é uma necessidade frequente nos animais (ZHARIKOV *et al.*, 2018), principalmente pela presença de hérnias traumáticas

associadas a quedas, chutes ou atropelamentos; podemos evidenciar uma grande ruptura na região, muitas vezes sem possibilidade de síntese por aproximação simples das bordas (FOSSUM, 2014).

Esse trabalho teve como objetivo verificar a biocompatibilidade da MCB implantada no subcutâneo, intramuscular e intraperitôneal de ratos Wistar por meio de análises histopatológicas e histoquímicas, avaliando os tipos e a presença ou ausência das reações inflamatórias em diferentes momentos, presença ou ausência de células gigantes, neovascularização e de tecido conjuntivo; e também comparando a distribuição e o arranjo das fibras de colágeno tipo I e III e de reticulina, ao redor da membrana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção das Membranas de Celulose Bacteriana (MCB)

As MCB foram obtidas a partir da cultura de *G. xylinus* ATCC 53582 preparada usando 100 mL do meio de Hestrin e Schramm a 30°C por 48 h sob agitação de 150 rpm. Depois disso, 106 células/mL⁻¹ foram retiradas do meio de cultura. Para a produção de NCB, foram utilizadas placas de 24 poços. Cada poço foi preenchido com 1 mL de meio de cultura inoculado. As placas foram mantidas a 30°C em cultura estática por 0, 24, 48, 72 e 96h. A seguir as membranas medindo um centímetro de diâmetro foram acondicionadas em tubos contendo solução PBS estéril conforme a metodologia de Jozala *et al.*, 2015.

2.2 Modelo Experimental

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da FMVZ/UNESP – Campus Botucatu-SP (CEUA), sob o protocolo nº 63/2019 (Anexo 1).

Cento e cinco ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus albinus*), machos e fêmeas com 200g de peso vivo, foram divididos em três grupos e eutanasiados em três momentos durante o experimento: 15, 30 e 60 dias de pós-operatório.

Os animais foram mantidos em ambiente controlado, em caixas individuais durante todos os tempos experimentais recebendo água e ração *ad libitum*, no Biotério de Estudos em Neuroinflamação da FFC/UNESP – Campus de Marília-SP.

A divisão dos grupos experimentais foi realizada de forma randomizada por sorteio nos dias dos procedimentos cirúrgicos, ou seja, os 105 animais foram divididos aleatoriamente em cada momento.

2.3 Procedimento cirúrgico

Após pesagem, os animais foram anestesiados mediante administração de associação anestésica de cloridrato de quetamina², na dose de 60mg/kg de peso corporal, cloridrato de xilazina³, na dose de 1mg/kg de peso corporal e de morfina na dose de 5mg/kg de peso corporal, aplicado por via intramuscular na face caudal do membro pélvico esquerdo. Foi realizada a assepsia com álcool 70%, após epilação manual dos sítios dos implantes.

Para a fixação da MCB no intraperitônio, foi realizada uma incisão na linha alba de 20 mm de comprimento, acessando a cavidade abdominal e a membrana foi fixada no peritônio do lado esquerdo do animal.

Na fixação da membrana no subcutâneo, foi realizada uma incisão da pele de 10 mm de comprimento na região cervical média, e a membrana foi fixada no subcutâneo do animal.

² Quetamina - Vetnil

³ Xilazin 2% - Syntec

Para o implante intramuscular, foi realizada incisão de 5mm de comprimento na face lateral do membro pélvico direito e a membrana foi fixada no interior do músculo bíceps femoral.

Nos três sítios de implantes, a fixação da membrana foi realizada com um ponto simples de sutura usando fio de nylon 5-0⁴. As membranas foram implantadas com um distanciamento seguro das incisões iniciais, com a finalidade de não haver interferências com processo cicatricial da incisão.

No pós-operatório, os animais receberam terapia para analgesia a base de tramadol⁵ na dose de 5mg/kg de peso corporal por três dias a cada 12 horas.

Após o período pós-operatório indicado para cada grupo, os animais foram eutanasiados sob sobredose anestésica de isoflurano⁶ em câmara de inalação e os sítios contendo as membranas implantadas, colhidos e fixados.

2.4 Análises histopatológicas

As lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina (HE) (MERCK & CO, 2021) foram analisadas pela microscopia de luz de forma quantitativa e qualitativa com relação aos seguintes parâmetros: presença ou ausência de reação inflamatória, de células gigantes, neovascularização, tecido conjuntivo e ao tipo das reações inflamatórias presentes. As lâminas coradas por Tricrômico de Masson, Reticulina e Picrosirius Red utilizando a técnica descrita por Junqueira *et al.*, (1978), foi verificado o tipo de fibra colágena envolvida no processo cicatricial.

⁴ Fio de nylon 5-0 – Shalon

⁵ Cronidor 2% - Agener União

⁶ Isoflorine - Cristália

As lâminas foram observadas em microscópio de luz polarizada modelo Olympus BX-41 com câmera de vídeo digital acoplada DP-25, marca Olympus do laboratório de Embriologia da FAMEMA – Faculdade de Medicina de Marília.

A leitura das lâminas foi realizada na forma de triplo-cego, ou seja, por três médicos veterinários com experiência na leitura das lâminas onde cada um dos observadores realizaram a classificação de forma independente e individual.

As reações inflamatórias, células gigantes, neovascularização e tecido conjuntivo foram classificados quanto a presença de alteração, sendo 0 para ausente (sem sinais das características), 1 para discreto (até 25% da variável analisada), 2 para moderado (até 50%) e 3 para intenso (acima de 75% de alteração presente na lâmina). Essas alterações inflamatórias também foram classificadas segundo ao tipo de infiltrado celular, podendo ser neutrofílico (predomínio de neutrófilos sem infecção), mononuclear (monócitos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos), granulomatoso (população mista de neutrófilos sem infecção, macrófagos e células gigantes), piogranulomatoso (população mista de neutrófilos com infecção, macrófagos e células gigantes) e eosinofílica (predominância de eosinófilos).

Nas colorações histoquímicas, foi avaliado o acúmulo de colágeno ao redor da membrana, nos diferentes grupos (15, 30 e 60), sendo possível a identificação qualitativa do colágeno do tipo III, com refringência verde, e do colágeno do tipo I, que apresenta refringência amarelada a avermelhada (JUNQUEIRA *et al.*, 1978).

2.5 Análises Estatísticas

Foi realizada análise estatística descritiva de todos os parâmetros avaliados.

Os parâmetros expressos em comparação das categorias entre os momentos 15, 30 e 60 dias foi utilizado o teste não paramétrico de Qui-Quadrado para comparar esses

valores em cada grupo e a correlação em a presença de reação inflamatória crônica *versus* a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana foi utilizado a Correlação de Spearmann, Quando a correlação é próxima de -1 então a relação é negativa, por outro lado a correlação próxima de 1 indica correlação positiva. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com valores de P inferiores ou igual a 0,05 (MORETTIN & BUSSAB, 2010).

Os programas utilizados para processamento dos dados foram Excel e R Core Team (2020).

2.6 Resultados

Os resultados dos parâmetros histológicos analisados foram distribuídos com os números de animais absolutos e em porcentagens com relação à presença ou ausência de alteração e ao tipo da reação inflamatória. Os números são apresentados na tabela 1 para a análise do subcutâneo, na tabela 3 para intramuscular e tabela 5 para intraperitoneal. Além disso, foi observada a presença de uma correlação positiva entre a presença de reação inflamatória crônica e a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana implantada, sendo assim a presença de tecido conjuntivo estava relacionada com o processo inflamatório presente. O resultado do valor de P da correlação entre o processo inflamatório e a fibrose no subcutâneo foi de 0,1155 aos 15 dias, 0,1823 aos 30 dias e 0,0113 aos 60 dias; no intraperitoneal foi de 0,3339 aos 15 dias, 0,0773 aos 30 dias e 0,0409 aos 60 dias. O valor de P no intramuscular foi considerado positivo apenas aos 60 dias de pós-operatório, sendo 0,0143. Os resultados são apresentados na tabela 2 para subcutâneo, na tabela 4 para intramuscular e tabela 6 para intraperitoneal.

TABELA 1 – Resultados da reação biológica com relação a presença e tipo da reação inflamatória e presença de células gigantes mononucleadas, neovascularização e tecido conjuntivo ao redor da membrana de celulose bacteriana implantada no subcutâneo, nos diferentes momentos.

<i>Coloração HE</i>	<i>Grupo</i>	<i>Ausente</i>	<i>Discreta</i>	<i>Moderada</i>	<i>Intensa</i>	<i>Valor de p</i>
Reação Inflamatória	15	0	14 (37,8%)	17 (45,9%)	6 (16,2%)	0,1859
	30	0	14 (41,2%)	12 (35,3%)	8 (23,5%)	
	60	0	13 (43,3%)	6 (20%)	11 (36,7%)	
Células Gigantes	15	4 (10,8%)	26 (70,3%)	7 (18,9%)	0	< 0,001
	30	0	10 (29,4%)	16 (47,1%)	8 (23,5%)	
	60	1 (3,3%)	12 (40%)	10 (33,3%)	7 (23,3%)	
Neovascularização	15	6 (16,2%)	26 (70,3%)	5 (13,5%)	0	0,0062
	30	9 (26,5%)	10 (29,4%)	13 (38,2%)	2 (5,9%)	
	60	3 (10%)	22 (73,3%)	4 (13,3%)	1 (3,3%)	
Tecido Conjuntivo	15	0	36 (97,3%)	1 (2,7%)	0	< 0,001
	30	1 (2,9%)	15 (44,1%)	17 (50%)	1 (2,9%)	
	60	1 (3,3%)	22 (73,3%)	6 (20%)	1 (3,3%)	
		<i>Neutrofílica</i>	<i>Mononuclear</i>	<i>Granulomatosa</i>	<i>Piogranulomatosa</i>	<i>Valor de p</i>
Tipo da Reação Inflamatória	15	1 (2,7%)	15 (40,5%)	4 (10,8%)	17 (45,9%)	< 0,001
	30	3 (8,8%)	2 (5,9%)	17 (50%)	12 (35,3%)	
	60	0	10 (33,3%)	12 (40%)	8 (26,7%)	

TABELA 2 – Correlação entre a presença de reação inflamatória crônica versus a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana no subcutâneo.

Momento	C. Spearman*	Valor de p
15	0,2632	0,1155
30	0,2343	0,1823
60	0,4560	0,0113

*Correlação de Spearman

TABELA 3 – Resultados da reação biológica com relação a presença e tipo da reação inflamatória e presença de células gigantes mononucleadas, neovascularização e tecido conjuntivo ao redor da membrana de celulose bacteriana implantada intramuscular, nos diferentes momentos.

<i>Coloração HE</i>	<i>Grupo</i>	<i>Ausente</i>	<i>Discreta</i>	<i>Moderada</i>	<i>Intensa</i>	<i>Valor de p</i>
Reação Inflamatória	15	0	22 (61,1%)	13 (36,1%)	2 (5,5%)	0,3333
	30	0	0	35 (85,4%)	6 (14,6%)	
	60			3 (13%)	20 (83,4%)	
Células Gigantes	15	2 (5,5%)	34 (94,5%)	0	1 (2,8%)	0
	30	0	12 (28,4%)	9 (21,4%)	20 (47,6%)	
	60	0	1 (4%)	1 (4%)	21 (91%)	
Neovascularização	15	3 (8,4%)	31 (86,1%)	3 (8,4%)	0	0,075
	30	1 (2,95%)	30 (88,3%)	3 (8,83%)	0	
	60	0	23 (100%)	0	0	
Tecido Conjuntivo	15	0	35 (97,2%)	2 (5,5%)	0	0
	30		35 (97,2%)	2 (5,5%)	0	
	60	0	35	2	0	
		<i>Neutrofílica</i>	<i>Mononuclear</i>	<i>Granulomatosa</i>	<i>Piogranulomatosa</i>	<i>Valor de p</i>
Tipo da Reação Inflamatória	15	0	2 (5,5%)	3 (8,4%)	32 (88,9%)	0
	30	5 (12%)	8 (20%)	0	28 (68%)	
	60	1 (4%)	0	0	23 (96%)	

TABELA 4 - Correlação entre a presença de reação inflamatória crônica versus a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana no intramuscular.

Momento	Valor P
15	0
30	0
60	0,0143

*Teste Qui-Quadrado

TABELA 5 – Resultados da reação biológica com relação a presença e tipo da reação inflamatória e presença de células gigantes mononucleadas, neovascularização e tecido conjuntivo ao redor da membrana de celulose bacteriana implantada intraperitoneal, nos diferentes momentos

<i>Coloração HE</i>	<i>Grupo</i>	<i>Ausente</i>	<i>Discreta</i>	<i>Moderada</i>	<i>Intensa</i>	<i>Valor de p</i>
Reação Inflamatória	15	0	13 (38,2%)	11 (32,4%)	10 (29,4%)	0,1502
	30	0	9 (25,7%)	13 (37,1%)	13 (37,1%)	
	60	3 (8,3%)	6 (16,7%)	13 (36,1%)	14 (38,9%)	
Células Gigantes	15	4 (11,8%)	9 (26,5%)	10 (29,4%)	11 (32,4%)	0,291
	30	2 (5,7%)	6 (17,1%)	6 (17,1%)	21 (60%)	
	60	5 (13,9%)	9 (25%)	10 (27,8%)	12 (33,3%)	
Neovascularização	15	10 (29,4%)	9 (26,5%)	12 (35,3%)	3 (8,8%)	< 0,001
	30	5 (14,3%)	28 (80%)	1 (2,9%)	1 (2,9%)	
	60	13 (36,1%)	21 (58,3%)	2 (5,6%)	0	
Tecido conjuntivo	15	3 (8,8%)	29 (85,3%)	1 (2,9%)	1 (2,9%)	< 0,001
	30	1 (2,9%)	33 (99,3%)	1 (2,9%)	0	
	60	2 (5,6%)	19 (52,8%)	15 (41,7%)	0	
		<i>Neutrofílica</i>	<i>Mononuclear</i>	<i>Granulomatosa</i>	<i>Piogranulomatosa</i>	<i>Valor de p</i>
Tipo da Reação Inflamatória	15	6 (17,6%)	1 (2,9%)	19 (55,9%)	8 (23,5%)	0,067
	30	2 (5,6%)	1 (2,9%)	17 (48,6%)	15 (42,9%)	
	60	2 (5,6%)	4 (11,1%)	8 (22,2%)	19 (52,8%)	

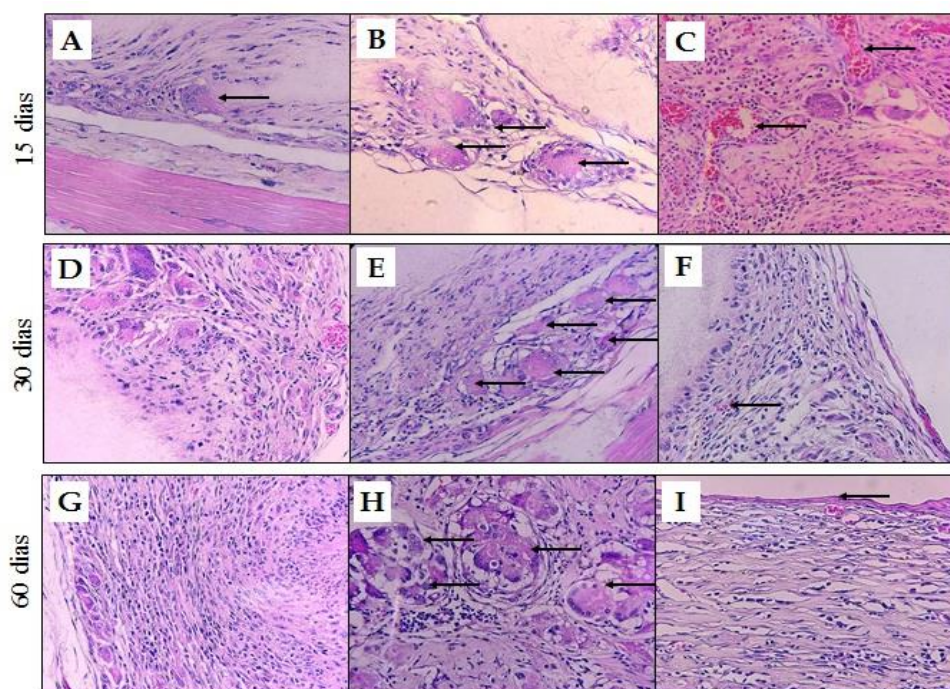
TABELA 6 - Correlação entre a presença de reação inflamatória crônica versus a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana no intraperitônio.

Momento	C. Spearman*	Valor P
15	0,1709	0,3339
30	-0,3026	0,0773
60	0,4560	0,0113

*Correlação de Spearman

Os resultados da análise histopatológica são apresentados na figura 1.

Figura 1 - - Fotomicrografia das alterações histopatológicas aos 15, 30 e 60 dias de pós-operatório do implante da membrana de celulose bacteriana intraperitoneal. Hematoxilina e Eosina, 40x.



(A) - Discreta inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho, notar célula gigante na seta; (B) - Presença moderada de células gigantes multinucleadas; (C) - Moderada neovascularização; (D) - Moderada inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho; (E) - Presença intensa de células gigantes multinucleadas; (F) - Discreta neovascularização; (G) - Intensa inflamação piogranulomatosa; (H) - Presença intensa de células gigantes multinucleadas; (I) - Discreta cápsula de tecido conjuntivo ao redor da membrana.

A análise das lâminas coradas pelas técnicas histoquímicas foi realizada de forma semi-quantitativa e revelou que pela coloração de Picrosirius Red, na microscopia de luz polarizada, aos 15 dias de pós-operatório, observou-se ao redor das membranas implantadas uma rede de fibras colágenas organizadas paralelamente a membrana que refringiam em tons de verde e amarelo e, ocasionalmente alaranjado, indicando-se tratar de fibras de colágeno tipo III em todas as membranas analisadas do subcutâneo e intraperitoneal. No intramuscular, a rede de fibras de colágeno formada refringiram tons de vermelho, ou seja, aos 15 dias de pós-operatório, o colágeno já era maduro, do tipo I. Na dependência da resposta inflamatória, a quantidade de fibras colágenas era

diretamente proporcional à inflamação, ou seja, quanto maior a reação inflamatória mais quantidade de rede de fibras colágenas.

Aos 30 dias de pós-operatório, há semelhança do que foi observado aos 15 dias, a quantidade das fibras colágenas ao redor da membrana também estava relacionada à quantidade de inflamação. Neste momento de observação, observou-se gradual modificação na coloração das fibras colágenas que adquiriram tonalidade alaranjada indicando polimerização do colágeno imaturo, tipo III (verde) para colágeno maduro, tipo I (vermelho) no subcutâneo e intraperitoneal. No intramuscular, o colágeno era vermelho, do tipo 1.

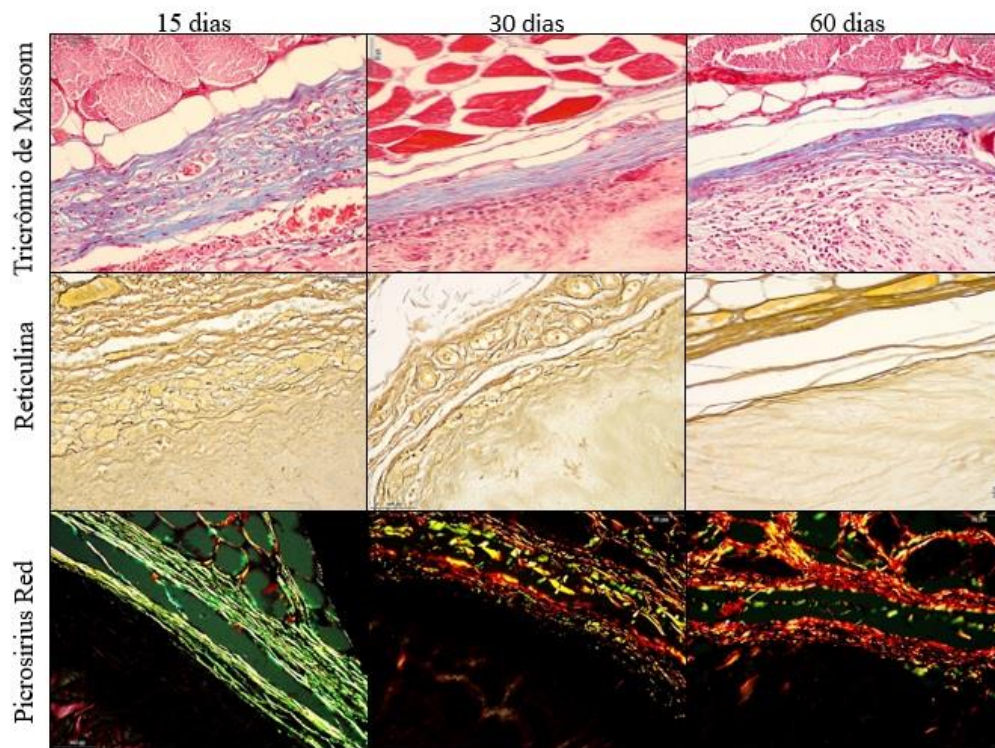
Aos 60 dias de pós-operatório, ao redor das membranas ficou evidente a organização e a compactação do colágeno ao redor da membrana que tinha coloração avermelhada e se apresentava de forma linear de menor espessura em todas as amostras.

Pela coloração de Tricrômico de Masson foi observado presença de fibras de colágenos em todos os momentos, sendo que aos 15 dias essa rede de fibras se apresentou maior, desorganizada e entrelaçada no infiltrado inflamatório. Aos 30 dias de pós-operatório a rede de fibras ainda se apresenta espessa e desorganizada, em meio do grande infiltrado inflamatório presente nesse momento, como visto aos 15 dias. Aos 60 dias de pós-operatório, essa rede de fibras de colágeno apresentou-se visivelmente mais organizada e em formato linear ao redor da membrana.

Na coloração de Reticulina, aos 15 dias de pós-operatório observou-se arranjo das fibras de reticulina delicada com discretas ramificações adentrando na membrana implantada. Aos 30 dias de pós-operatório, notou-se reticulina delicada com ramificações em menor intensidade. Aos 60 dias de pós-operatório, ao redor da membrana, ficou evidente a organização e união das fibras de reticulina.

Podemos observar a distribuição e o arranjo de fibras colágenas do subcutâneo na figura 1, intramuscular na figura 2 e intraperitoneal na figura 3.

Figura 2 - Histoquímica – Fotomicrografia do subcutâneo. Objetiva de 40x.

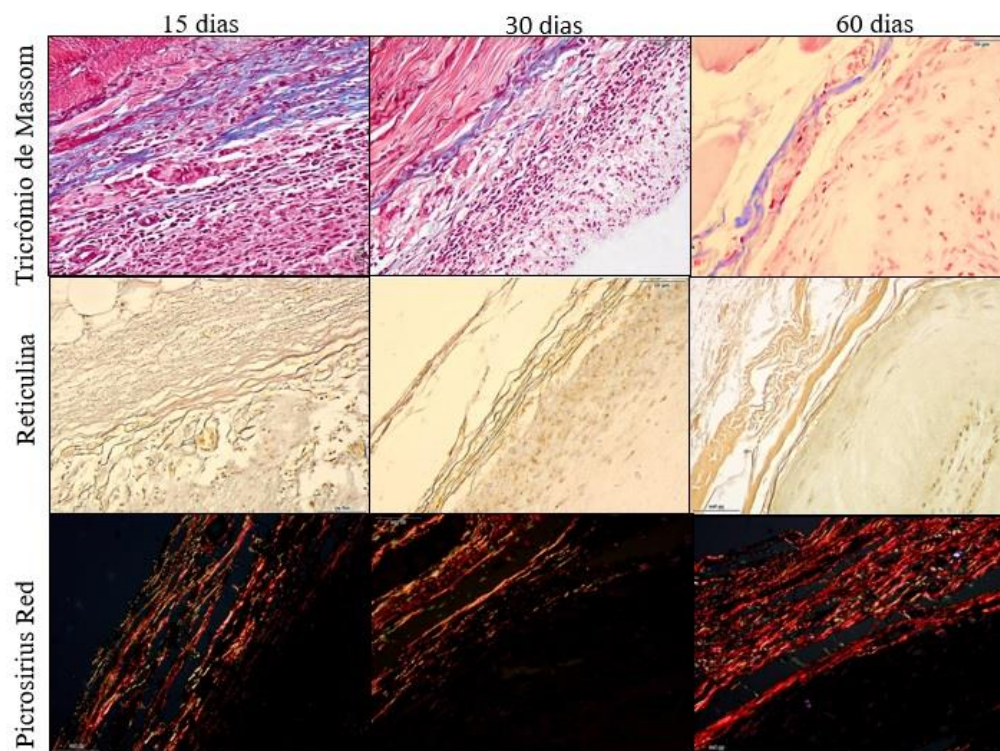


Tricrômio de Masson: notar as fibras de colágeno ao redor da nanomembrana coradas em azul;

Reticulina: notar a presença de delicadas fibras reticulares coradas em negro na interface entre a membrana e o peritônio;

Picrosirius Red sob luz polarizada, notar colágeno tipo I (vermelho) e colágeno tipo III (verde).

Figura 3 - Figura 4: Histoquímica – Fotomicrografia intramuscular. Objetiva de 40x.

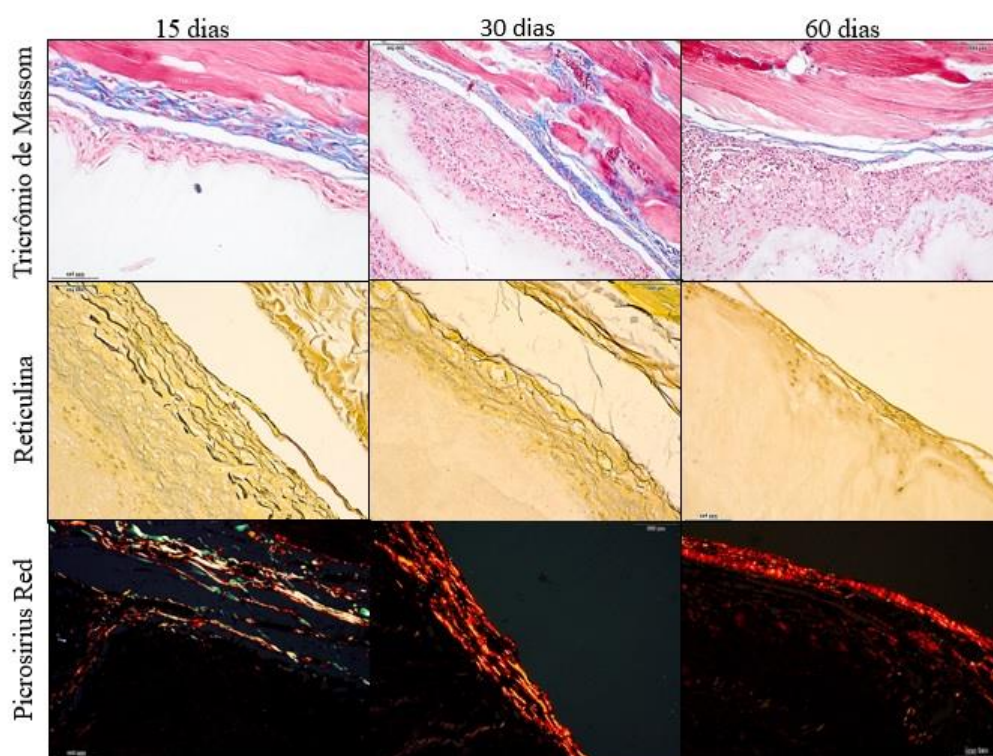


Tricrômico de Masson: notar as fibras de colágeno ao redor da nanomembrana coradas em azul;

Reticulina: notar a presença de delicadas fibras reticulares coradas em negro na interface entre a membrana e o peritônio;

Picrosirius Red sob luz polarizada, notar colágeno tipo I (vermelho).

Figura 4 - Histoquímica – Fotomicrografia intramuscular. Objetiva de 40x.



Tricrômico de Masson: notar as fibras de colágeno ao redor da nanomembrana coradas em azul;

Reticulina: notar a presença de delicadas fibras reticulares coradas em negro na interface entre a membrana e o peritônio;

Picrosirius Red sob luz polarizada, notar colágeno tipo I (vermelho) e colágeno tipo III (verde).

2.7 Discussão

A biocompatibilidade é um dos principais requisitos de qualquer biomaterial implantado e pode ser definida como a capacidade de permanecer em contato com tecido vivo sem causar danos ao tecido. (WILLIAMS, 2008).

A MCB é geralmente considerado um material biocompatível, embora, poucos estudos relataram o estudo do destino de implantes da membrana in vivo. Neste trabalho, avaliamos a reação biológica da membrana implantada no subcutâneo, intramuscular e intraperitoneal, através do tipo de reação inflamatória e das fibras colágenas e de

reticulina presentes (FARNESI BASSI *et al.*, 2020; ZHARIKOV *et al.*, 2018; TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Diferente do esperado, no presente experimento os implantes da membrana apresentaram uma reação inflamatória do tipo corpo estranho que permaneceu aos 60 dias em todos os sítios. A atividade inflamatória observada nas análises histológicas, que persistiu em todos os períodos, pode ser consequência do biomaterial se apresentar como uma substância estranha para o hospedeiro (conforme foi observado na tabela 1, tabela 2, tabela 3 e figura 1).

Análises sistemáticas da biocompatibilidade dos biomateriais são essenciais para o uso na engenharia de tecidos. Um implante no subcutâneo de camundongos foi analisado por Koyama e seus colaboradores (2006), que descobriram que o tecido implantado apresentava uma reação inflamatória grave e a formação de uma massa semelhante a um abscesso. Com isso, esse implante foi estudado e deu origem a outros implantes, que biologicamente não causavam danos. Sendo assim, é possível que a membrana de celulose bacteriana estudada nesse trabalho possa vir a ser usada como um dispositivo médico após adotar algumas estratégias, como incorporação de enzimas, de proteínas e fatores antigênicos, com o propósito de que a membrana possa apresentar melhores resultados (SHEIKH *et al.*, 2017).

Uma discreta cápsula de tecido conjuntivo foi formada ao redor da membrana aos 15 dias de pós-operatório, permanecendo presente aos 60 dias, resultado do mecanismo de defesa do organismo do animal. Osorio *et al.*, 2017 pesquisaram a biocompatibilidade de biomateriais de celulose bacteriana encontraram resultados semelhante ao nosso, e afirmaram que a presença da cápsula de tecido conjuntivo é um comportamento comum para a maioria dos biomateriais implantáveis.

A neovascularização na periferia da membrana, foi marcadamente reduzida, pois esteve abundante aos 15 dias de pós-operatório, se tornando discreta aos 60 dias, como também foi observado por Pértile *et al.*, 2013, que estudaram a biocompatibilidade da membrana de celulose bacteriana implantada no subcutâneo de camundongos. Apesar disso, os autores afirmaram que os implantes causaram uma reação inflamatória neutrofílica leve que diminuiu com o tempo e não desencadeou reação de corpo estranho, resultado contrário do que foi observado nesse estudo.

A formação da rede de fibras colágenas esteve presente desde os momentos iniciais, e o colágeno inicial (colágeno tipo III) foi sendo substituído por um colágeno maduro (colágeno tipo I), mais resistente e organizado ao longo das linhas de tensão. Embora a formação das fibras de colágeno, organizadas e maduras, esteja relacionada com um processo de cicatrização, a permanência da reação inflamatória crônica com reação a corpo estranho inibe a compatibilidade do implante com o organismo do animal. Foi confirmado pela análise estatística que existe uma correlação positiva entre a presença do tecido conjuntivo e a reação inflamatória crônica, ou seja, a presença de tecido conjuntivo ao redor da membrana está relacionada com o processo inflamatório presente. Esses resultados corroboram com Sepúlveda *et al.*, 2016, que estudaram a biocompatibilidade do implante da membrana de celulose bacteriana em córnea de coelhos, e com Farnezi Bassi *et al.*, 2020, onde avaliaram a viabilidade da mesma membrana para propriedade osteopromotora em ratos Wistar, e concluíram que, como consequência dos implantes, houve uma resposta inflamatória crônica do tipo corpo estranho.

2.6 Conclusão

Podemos concluir que a MCB é considerada um material para implantes com características de biocompatibilidade. Uma discreta cápsula de tecido conjuntivo pode ser aceitável para um implante, porém não podemos caracterizar como biocompatível a presença de reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho no final do tempo estudado. No entanto, nosso trabalho aponta uma necessidade de investigação mais aprofundada para que possa ser usado como dispositivo médico.

AGRADECIMENTOS

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 88887.360903/2019-00".

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse potenciais que possam influenciar ou distorcer o conteúdo deste manuscrito.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "Biocompatibilidade da nanocelulose bacteriana no subcutâneo, intramuscular ou intraperitoneal – Estudo experimental em ratos Wistar" Protocolo nº 63/2019 - CEUA, do Professor Alexandre Hataka, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade em 15 de abril de 2019.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 15 de junho de 2020.



Prof. Ass. Dr. José Nicolau Próspero Puoli Filho
Presidente da CEUA/FMVZ



UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof.Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880.2175 – sta@fmvz.unesp.br – www.fmvz.unesp.br



4. CONCLUSÃO GERAL

A MCB é considerada um material para implantes com características de biocompatibilidade. Uma discreta cápsula de tecido conjuntivo pode ser aceitável para um implante, porém até o momento, não se pode caracterizar a MCB como biocompatível devido a presença de reação inflamatória granulomatosa do tipo corpo estranho no final do tempo estudado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I.F.; PEREIRA, T.; SILVA, N.H.C.S.; GOMES, F.P.; SILVESTRE, A.J.D.; FREIRE, C.S.R.; SOUSA, J.M.; Costa, P.C. **Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 86, p. 332-336, 2014.

DIBELLO, J. N.; MOORE J. H. **Sliding myofascial flap of the rectus abdominus muscles for the closure of recurrent ventral hernias.** Plastic Reconstructive Surgery, v. 98, p. 464- 699, 1996.

DOURADO, F., GAMA, M.; RODRIGUES, A.C. **A Review on the toxicology and dietetic role of bacterial cellulose.** Toxicology Reports, v. 4, p. 543-553, 2017.

FARNEZI BASSI, A. P., BIZELLI, V. F., BRASIL, L., PEREIRA, J. C., AL-SHARANI, H. M., MOMESSO, G., FAVERANI, L. P., & LUCAS, F. A. **Is the Bacterial Cellulose Membrane Feasible for Osteopromotive Property?** Membranes (Basel), v.10(9), p. 230, 2020. Doi.org/10.3390/membranes10090230

FOSSUM, T.W. Cirurgia da Cavidade Abdominal. In: _____. **Cirurgia de pequenos animais.** São Paulo: ROCA, 2005. Cap.20, p.261-269.

FU, L.; ZHOU, P.; ZHANG, S.; YANG, G. **Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large area skin transplantation.** Materials Science and Engineering C, v.33, p. 2995-3000, 2013. Doi: 10.1016/j.msec.2013.03.026.

GAÑÁN, P.; ROJAS, O.J.; TRUJILLO, I.O.; CASTRO, C. **Bioactive 3D-Shaped Wound Dressings Synthesized from Bacterial Cellulose: Effect on Cell Adhesion of Polyvinyl Alcohol Integrated.** In Situ. Int. J. Polym. Sc, p. 1-10, 2017.

HALIB, N.; PERRONE, F.; CEMAZAR, M.; DAPAS, B.; FARRA, R.; ABRAMI, M.; CHIARAPPA, G.; FORTE, G.; ZANCONATI, F.; POZZATO, G.; MURENA, L.; FIOTTI, N.; LAPASIN, R.; CANSOLINO, L.; GRASSI, G.; GRASSI, M. **Potential Applications of Nanocellulose-Containing Materials in the Biomedical Field.** Materials (Basel), v, 10, p. 977, 2017. Doi: 10.3390/ma10080977.

JOZALA, A.F.; DE LENCASTRE-NOVAES, L.C.; LOPES, A.M.C; SANTOS-EBINUMA, V.; MAZZOLA, P.; GAVA PESSOA-JR, A.; GROTO, D.; GERENUTTI, M.; CHAUD, M.V. **Bacterial cellulose production by Gluconacetobacter xylinus by employing alternative culture media.** Appl Microbiol Biotechnol, v. 99, p. 1181–1190, 2015. Doi: 10.1007/s00253-014-6232-3

JUNQUEIRA LC, COSSERMELLI W, BRENTANI RR. **Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy.** Archivum Histologicum Japonicum, v. 41, p. 267-274, 1978.

KESHK, S.M. **Bacterial cellulose production and its industrial applications**. Journal Bioprocess Biotech, v. 4, p.150, 2014. Doi:10.4172/2155-9821.1000150

KLEMM, D.; KRAMER, F.; MORITZ, S.; LINDSTRÖM, T.; ANKERFORS, M.; GRAY, D.; DORRIS, A. **Nanocelluloses: a new family of nature-based materials**. Angew Chem Int Ed Engl, v. 50, p. 5438–5466, 2011. Doi:10.1002/anie.201001273.

LEE, S.; LIM, Y.; JEONG, S.; AN, S.; KANG, S.; JEONG, C.; HUH, J. **The effect of bacterial cellulose membrane compared with collagen membrane on guided bone regeneration**. The Journal of Advanced Prosthodontics, v. 7, p. 484-95, 2015. Doi.org/10.4047/jap.2015.7.6.484

LIMA, H.L.S., GONÇALVES, C., CERQUEIRA, M.Â. **Bacterial cellulose nanofiber-based films incorporating gelatin hydrolysate from tilapia skin: production, characterization and cytotoxicity assessment**. Cellulose, v. 25, p. 6011–6029, 2018. Doi.org/10.1007/s10570-018-1983-0

MERCK & CO. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. 13th ed. Whitehouse Station (NJ), 2001. Disponível em: <http://www.msdbrazil.com/msd43/m_manual>. Acesso em: 10/02/2021.

MORETIIN, P.A., e BUSSAB, W.O. Estatística Básica. 6 ed. São Paulo, Saraiva, 2010.

OSORIO, M.; VELÁSQUEZ-COCK, J.; RESTREPO, L.M.; ZULUAGA, R.; PÉRTILE, R. A. N., MOREIRA, S., GIL DA COSTA, R. M., CORREIA, A., GUÃRDAO, L., GARTNER, F.; GAMA, M. **Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies**. Journal of Biomaterials Science, v. 23, p. 1339-1354, 2012. Doi:10.1163/092050611x581516

PÉRTILE, R. A. N., MOREIRA, S., GIL DA COSTA, R. M., CORREIA, A., GUÃRDAO, L., GARTNER, F. **Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies**. Journal of Biomaterials Science, v. 1–16. Doi:10.1163/092050611x581516

PICHETH, G.F.; PIRICH, C.L.; SIERAKOWSKI, M.R.; WOHL, M.A.; SAKAKIBARA, C.N.; SOUZA, C.F.; MARTIN, A.A.; SILVA, R.; FREITAS, R.A. **Bacterial cellulose in biomedical applications: A review**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 104, p.97-106, 2017.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M.; **Biomaterials: types, applications, and Market**. Revista Química Nova, v. 38, n. 7, p. 957-971. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094> Acesso em: 09/02/2021.

PREVEL, C.D.; EPPLEY, B.L.; SUMMERLIN, D.J.; JACKSON, J.R.; MCCARTY, M.; BADYLAK, S.F. **Small intestinal submucosa: utilization for repair of rodent abdominal wall defects**. Annals of Plastic Surgery, v. 35, p. 374-380, 1995.

SEPÚLVEDA, R.V.; VALENTE, F.L.; REIS, E.C.C.; ARAÚJO, F.R.; ELEOTÉRIO, R.B.; QUEIROZ, P.V.S.; BORGES, A.P.B. **Bacterial cellulose and bacterial cellulose/polycaprolactone composite as tissue substitutes in rabbits' córnea**. Pesq. Vet. Bras, v. 36, p. 986-992, 2016.

SHEIKH Z.; QURESHI J.; ALSHAHRANI M.A.; NASSAR H.; IKEDA Y.; GLOGAUER M.; GANSS B. **Collagen based barrier Membr. for periodontal guided bone regeneration applications.** *Odontology*, v. 105, p. 1-12, 2016. Doi: 10.1007/s10266-016-0267-0

TEIXEIRA, S.R.Z.; REIS, E.M.; GIANNINI, P.; MEIER, M.M.; NOGUEIRA, A.L.; GARCIA, M.C.F.; SCHNEIDER, A.L.S.; PEZZIN, A.; PORTO, L.M. **Biosynthesis and Functionalization of Bacterial Cellulose Membranes with Cerium Nitrate and Silver Nanoparticles.** *Materials Research*, v. 22, 2019. Doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2019-0054

VAN LOEY, N.E.; VAN SON, M.J. **Psychopathology and psychological problems in patients with burn scars: epidemiology and management.** *Am J Clin Dermatol.*, v. 4, p. 245-272, 2003. Doi: 10.2165/00128071-200304040-00004. PMID: 12680803.

VIELREICHER, M.; KRALISCH, D.; VÖLKL, S. **Bacterial nanocellulose stimulates mesenchymal stem cell expansion and formation of stable collagen-I networks as a novel biomaterial in tissue engineering.** *Sci Rep*, v. 8, p. 9401, 2018. Doi.org/10.1038/s41598-018-27760-z

WILLIAN, D.F. **On the mechanisms of biocompatibility.** *J. Biomaterials*, v. 29, p. 2941-2953, 2008.

ZHARIKOV, A.N.; LUBYANSKY, V.G.; GLADYSHEVA, E.K.; SKIBA, E.A.; BUDAEVA, V.V.; SEMYONOVA, E.N.; ZHARIKOV, A.A.; SAKOVICH, G.V. **Early morphological changes in tissues when replacing abdominal wall defects by bacterial nanocellulose in experimental trials.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 29, p. 95, 2018.



APPLIED MATERIALS TODAY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.1
• Guide for Authors	p.4



DESCRIPTION

Applied Materials Today is a multi-disciplinary, rapid-publication journal focused on cutting edge applications of novel materials.

New materials discoveries have led to exciting fundamental breakthroughs. Materials research is now moving towards the translation of these scientific properties and principles to applied technologies. *Applied Materials Today* covers all aspects of materials application, spanning chemistry, physics, engineering, and biology: publishing high impact articles on novel electronic, optical, mechanical, and energy devices, as well as medicine, the environment and the impact on society.

Part of the *Materials Today* family, *Applied Materials Today* offers authors rigorous peer review, rapid decisions, and high visibility. The editors welcome comprehensive articles, short communications and reviews on topics including but not limited to: Two dimensional materials Wearable electronics 3D printing/Additive manufacturing Materials for energy Functional materials Materials synthesis Nanomaterials and nanotechnology Biomaterials and nanomedicine Ramifications on society Health and environmental impact Research commercialization Fundamental principles with a view to specific applications

IMPACT FACTOR

2020: 10.041 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2021

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
Science Citation Index Expanded
INSPEC

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

M. Pumera, University of Chemistry and Technology Prague Department of Inorganic Chemistry, Praha, Czechia

GUIDE FOR AUTHORS

Types of article

The journal publishes high quality Original Research Articles, Short Communications and Reviews: the Editors welcome submission of these article types. In addition, the journal also publishes Comments, Editorials, and Correspondences: it is recommended that authors discuss contributions of these types with the Editor(s) prior to submission.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of competing interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. [More information.](#)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in

English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of [electronic artwork](#).

Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambueh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article, *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Ogiuro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinson, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88), Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal supports and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data Linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#), a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to Mendeley Data. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to Mendeley Data.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, authors are required to include a 'Data availability' section in their manuscript prior to their reference section. The intention of this section is to provide readers with information on where they can obtain the research data required to reproduce the work reported in the manuscript. This may also be a requirement of your funding body or institution. For more information on specific requirements, please visit the [Materials Today Data Statement page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple *MethodsX* articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. *MethodsX*, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their *MethodsX* article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to *MethodsX* where it will be editorially reviewed. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *MethodsX*. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your *MethodsX* article.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.