



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

THAMYRES FREIRE DA SILVA

**CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA
FRUTALINA DA *Artocarpus incisa* L.**

FORTALEZA

2022

THAMYRES FREIRE DA SILVA

CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA
FRUTALINA DA *Artocarpus incisa* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fábiana Karine Andrade.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S584c Silva, Thamyres Freire da.
CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA FRUTALINA DA
Artocarpus incisa L. / Thamyres Freire da Silva. – 2022.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Fábيا Karine Andrade.

Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira.

1. Celulose bacteriana. 2. Lectina. 3. Artocarpus Incisa L.. 4. Curativo. I. Título.

CDD 660

THAMYRES FREIRE DA SILVA

CURATIVO BIOATIVO DE BIOCELULOSE ASSOCIADO À LECTINA
FRUTALINA DA *Artocarpus incisa* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Fábيا Karine Andrade (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Silveira Vieira (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Niédja Fittipaldi Vasconcelos
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, meus familiares e amigos que são minha estrutura e me ajudaram a encerrar mais um ciclo.

Agradeço à minha orientadora e coorientador por todos os ensinamentos e troca de experiência profissional. Obrigada por terem me proposto um tema de pesquisa que me ajudou a superar meus limites e amadurecer um pouco mais.

Agradeço a todos professores, alunos e ex-alunos da UFC que colaboraram de alguma forma com as partes que compuseram esse trabalho. Muito obrigada por terem repassado o que puderam de conhecimento e experiência, sempre que possível farei o mesmo. Sozinha eu não teria conseguido.

Agradeço ao CNPq pelo fomento com a bolsa de mestrado para realização desse trabalho.

“Se você vai ser espectador de você
mesmo até o fim é melhor que se
encante com o que faz”

(Clóvis de Barros Filho)

RESUMO

Curativos constituem um segmento importante do mercado médico e farmacêutico para o tratamento de feridas em todo o mundo e tem evoluído desde matrizes passivas, que simplesmente cobrem e protegem a ferida, até as que promovem a entrega de bioativos. A celulose produzida por fermentação bacteriana, conhecida como biocelulose (CB), é um material de alta pureza e que tem sido utilizado para a produção de curativos passivos. A matriz de CB ao ser associada com uma molécula, que atua no processo de cicatrização, passa a ser um curativo bioativo. A CB foi oxidada com periodato de sódio para produzir 2,3 dialdeído celulose (CBOXI), objetivando modular sua biodegradabilidade e taxa de liberação do composto bioativo. A oxidação proporciona grupamentos aldeídos disponíveis para interagir com os bioativos. As proteínas do gênero *Artocarpus* tem mostrado ação cicatrizante, como ArtinM (anteriormente chamada Artocarpin ou KM+) que já foi usada em formulações para tratamento de feridas. O objetivo deste trabalho foi criar um modelo de incorporação da lectina frutalina (FTL) da *Artocarpus incisa L* (molécula bioativa) em CB e CBOXI. O desempenho de curativos CBOXI-FTL e da CB-FTL foi avaliado com variáveis independentes: temperatura (5, 15, e 25 °C), tempo de imobilização (6, 15, e 24 h) e concentração de frutalina (20, 60, e 100 µg mL⁻¹). As amostras CBOXI-FTL 1 (44,96 ± 1,34) e CBOXI-FTL 6 (23,28 ± 1,43) obtiveram maiores rendimentos percentual de incorporação da lectina quando comparada a CB-FLT 1 (21.71 % ± 1.57) e CB-FTL 6 (16.91 % ± 1.05). Foi realizado teste de Microscopia de Fluorescência Confocal confirmando a imobilização da FTL pela visualização do complexo florescente FTL-FITC na membrana. Nos testes de viabilidade celular a FTL se mostrou não citotóxica para culturas de fibroblastos (L-929) <50 µg/mL após 24 h de contato, apresentando toxicidade após 48 h. CBOXI-FTL também mostrou-se não citotóxico e com tendência a acelerar o fechamento da ferida *in vitro* quando comparado ao controle de somente células em meio de cultura suplementado. Cerca de 97 % e 90 % da lectina dos curativos CBOXI-FTL 6 e CB-FTL 6, respectivamente, foi liberada em PBS (pH 7,4) durante 48 h. Esses são resultados promissores, que mostram que o curativo apresenta potencial para o tratamento de feridas.

Palavras-chave: Celulose bacteriana. Lectina. *Artocarpus Incisa L*. Curativo.

ABSTRACT

Dressings are an important segment of the medical and pharmaceutical market for the treatment of wounds around the world and have evolved from passive matrices, which simply cover and protect the wound, to those that promote the delivery of bioactives. Cellulose produced by bacterial fermentation, known as bacterial cellulose (BC), is a highly pure material that has been used to produce passive dressings. When the BC matrix is associated with a molecule that acts on the healing process, it becomes a bioactive dressing. The BC was oxidized with sodium periodate to produce 2,3 dialdehyde cellulose (BCOXI), with the aim of modulating its biodegradability and the rate of release of the bioactive compound. The oxidation provides aldehyde groups available to interact with the bioactive compounds. Proteins from the genus *Artocarpus* have shown healing action, such as ArtinM (previously called Artocarpin or KM+) which has already been used in wound treatment formulations. The aim of this work was to create a model for incorporating frutalin lectin (FTL) from *Artocarpus incisa* L (bioactive molecule) into BC and BCOXI. The performance of BCOXI-FTL and BC-FTL dressings was evaluated using independent variables: temperature (5, 15 and 25 °C), immobilization time (6, 15 and 24 h) and frutalin concentration (20, 60 and 100 µg mL⁻¹). The samples BCOXI-FTL 1 (44.96 ± 1.34) and BCOXI-FTL 6 (23.28 ± 1.43) obtained higher percentage yields of lectin incorporation when compared to BC-FTL 1 (21.71 % ± 1.57) and BC-FTL 6 (16.91 % ± 1.05). A Confocal Fluorescence Microscopy test was carried out, confirming the immobilization of FTL by visualizing the FTL-FITC fluorescent complex on the membrane. In cell viability tests, FTL proved to be non-cytotoxic to fibroblast cultures (L-929) <50 µg/mL after 24 h of contact, showing toxicity after 48 h. The BCOXI-FTL also proved to be non-cytotoxic and tended to accelerate wound closure *in vitro* when compared to the control of only cells in supplemented culture medium. Around 97 % and 90 % of the lectin from the BCOXI-FTL 6 and BC-FTL 6 dressings, respectively, was released in PBS (pH 7.4) over 48 h. These are promising results, which show that the dressing has potential for wound treatment.

.

Keywords: Bacterial cellulose. Lectin. *Artocarpus Incisa* L. Dressing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Camadas da pele humana.	19
Figura 2: Mecanismo de reação de oxidação da celulose com metaperiodato de sódio.....	23
Figura 3: MEV de membranas de (A) celulose bacteriana purificada por solução alcalina e oxidada por metaperiodato de sódio (CBoxi) e (B) celulose bacteriana (CB) somente purificada.....	24
Figura 4: (A) Estrutura tridimensional representativa da frutalina. (B) Fruta-pão.	25
Figura 5: Estrutura da frutalina tetramérica ligada a D-galactose (vermelho). .	26
Figura 6: Sítio de reconhecimento a carboidrato da frutalina em verde; ligante D-galactose em vermelho, pontes de hidrogênio em amarelo e moléculas de água “X” vermelho.....	27
Figura 7: Etapas da estratégia experimental.....	29
Figura 8: Purificação da lectina de <i>Artocarpus incisa</i> L. e análise de pureza...	31
Figura 9: Processo de produção e oxidação da membrana de CB.	33
Figura 10: Processo de adsorção de frutalina nas membranas de biocelulose (CB) e biocelulose oxidada (CBOXI).	34
Figura 11: Esquema da montagem da célula de difusão de Franz.	38
Figura 12: Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR-ATR). Das amostras de com controle sem frutalina, CBOXI e CB, e das amostras com a lectina, CBOXI-FTL 6, CBOXI-FTL 1, CB-FTL 6, CB-FTL 1.....	45
Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os curativos OXI 1 (A) e CB 1 ambas com frutalina (B).....	46
Figura 14: Células de eritrócitos hemaglutinadas com frutalina-FITC.	47
Figura 15: Imagens digitais do ensaio de microscopia de fluorescência confocal. Neste ensaio a FTL foi previamente ligada ao FITC, um fluoróforo, e então incorporada as membranas de biocelulose. A Figura mostra CB (A) e CBOXI (B) que são sem FTL e CB-FTL-FITC (C) e CBOXI-FTL-FITC (D) com FTL, respectivamente.	47
Figura 16: Perfil de liberação da FTL nos curativos CB-FTL 6 e CBOXI-FTL 6.	48

Figura 17: Análise de atividade hemaglutinante de alíquotas de PBS em contato com as amostras por 24 h e 48 h em duplicata.	50
Figura 18: Citotoxicidade da frutalina purificada em fibroblastos (L929).	51
Figura 19: Citotoxicidade amostras em queratinócitos (HaCat).	51
Figura 20: Citotoxicidade amostras em fibroblastos (L929).	52
Figura 21: Imagens capturadas do ensaio de migração de fibroblastos sob efeito dos curativos para os tempos de 0, 6, 12, 18 e 24 h de contato da amostra. ..	53
Figura 22: Teste microbiano de disco difusão para CBOXI e CB com frutalina adsorvida na concentração de 100 µg/mL.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes estudadas do planejamento experimental.....	35
Tabela 2: Matriz do planejamento experimental comum entre CB e CBOXI....	36
Tabela 3: Matriz do planejamento 2 ³ para celulose bacteriana oxidada (CBOXI).	43
Tabela 4: Matriz do planejamento 2 ³ para celulose bacteriana (CB).....	43
Tabela 5: Taxa de redução do Scratch (%)......	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CB	Celulose Bacteriana
CBOXI	Celulose Bacteriana Oxidada
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBS	Soro Fetal Bovino
FITC	isocianato de fluoresceína
FTIR	Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho
IgA	Imunoglobulina A
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão Fosfato-Salino
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil-sulfato de sódio (SDS).
ATR	Reflectância Total Atenuada
FTL	Frutalina

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
h	Horas
KDa	Quilodalton
m	Metro
M	Molaridade
mg	Miligrama
mL	Mililitros
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos específicos	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1 Pele.....	18
3.2 Cicatrização da pele e tratamento de feridas.....	20
3.3 Curativos bioativos	21
3.4 Matriz de celulose bacteriana	22
3.5 Frutalina: uma lectina da semente de <i>Artocarpus incisa</i> L.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Materiais	29
4.1.1 Sementes para obtenção da frutalina.....	29
4.1.2 Reagentes.....	30
4.2 Métodos	30
4.2.1 Purificação da lectina, teste de pureza e atividade hemaglutinante. 30	
4.2.2 Produção e purificação de CB.....	32
4.2.3 Oxidação da CB	32
4.2.4 Adsorção da lectina nas membranas	33
4.2.4.1 Planejamento experimental da adsorção da lectina nas membranas CB e CBOXI	35
4.2.5 Técnicas de caracterização dos curativos FTL-CB e FTL-CBOXI.	36
4.2.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR). 36	
4.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	36
4.2.5.3 Microscopia de Fluorescência Confocal.....	37
4.2.5.4 Ensaio de liberação em célula de difusão tipo Franz	37

4.2.5.5 Hemaglutinação dos extratos de membranas em tampão PBS pH 7,4	39
4.2.5.6 Avaliação da citotoxicidade da frutalina e dos curativos	40
4.2.5.7 Migração de fibroblastos	41
4.2.5.8 Ensaio microbiológico qualitativo	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1 Análise experimental.....	42
5.3 Testes <i>in vitro</i>	50
5.4 Ensaio de atividade antimicrobiana	54
6 CONCLUSÃO.....	57
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
8 REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

A pele defende o organismo de toxinas e microrganismos formando uma barreira protetora (COALSON *et al.*, 2019) e quando lesionada curativos podem ser usados para proteger a área danificada, evitando que agressores externos ao corpo não piorem a ferida. O processo de cicatrização é complexo envolvendo os sistemas imunes do corpo, e bem organizado nas etapas de hemóstase, inflamação, proliferação e remodelação da matriz extracelular (ZHONG *et al.*, 2021).

Os curativos tradicionais são geralmente capazes apenas de agir passivamente frente ao processo de cicatrização, servindo como coberturas que evitam a perda de umidade no local da ferida e protegem o local de agentes químicos, físicos ou biológicos (MIGUEL *et al.*, 2019). Contudo, apesar de alguns materiais terem se mostrado bem-sucedidos no processo de cura de feridas, ainda é necessária a busca por novos materiais com melhores propriedades cicatrizantes, com custos compatíveis aos produtos existentes no mercado e que possam ser manejados de forma confortável para o paciente mantendo inclusive a mobilidade dos tecidos locais (LI, MENG *et al.*, 2022).

Curativos com matrizes poliméricas naturais biocompatíveis como a biocelulose ou celulose bacteriana (CB), alginato, quitosana e colágeno estão disponíveis no mercado como uma alternativa aos curativos convencionais (THADEPALLI, 2021). A CB pode ser utilizada na forma de membranas ou hidrogéis, sendo um polímero com elevada pureza, alta resistência mecânica (quando úmido), flexível, poroso, biocompatível (atóxico e não alergênico), biodegradável e autoclavável, bastante indicado para aplicações biomédicas (ASANARONG *et al.*, 2021; LUZ, ERIKA PATRÍCIA CHAGAS GOMES *et al.*, 2020; MOREIRA FILHO *et al.*, 2020).

Diante das características que a CB apresenta e com base no seu desempenho clínico, a membrana de CB pode ser considerada um material ideal para a produção de curativos de alta qualidade. No entanto, os curativos de CB atualmente disponíveis no mercado atuam de forma semelhante aos curativos tradicionais, apenas permitem as trocas gasosas do ferimento, bloqueiam a contaminação por bactérias e mantêm a umidade adequada no ambiente da

ferida. Ao se incorporar bioativos na matriz de CB é possível obter um curativo bioativo, ou seja, que atue ativamente no processo de cicatrização, diminuindo o tempo de cura.

Com o intuito de melhorar as propriedades da CB e/ou conferir a ela novas funcionalidades, modificações químicas em sua superfície tem sido uma estratégia para agregar versatilidade ao material. A modificação química com periodato permite a inserção de grupamentos químicos na CB que promove a melhor capacidade de imobilização de bioativos de origem proteica na sua estrutura (COSERI et al., 2013).

Dessa forma, este trabalho propõe um modelo de produção de curativos bioativos à base de CB incorporado com a lectina frutalina (*Artocarpus incisa L.*), purificada a partir das sementes da fruta-pão-de-carço. Quanto a classificação esta proteína está inserida no grupo de lectinas classificadas por (DAMME et al., 1998) denominadas relacionadas à jacalina (*Artocarpus integrifolia*), pela relação estrutural (VIEIRA NETO, 2019). Uma das diferenças à lectina da semente da jaca, seria que a frutalina possui uma maior atividade hemaglutinante (NOBRE et al., 2010).

A escolha dessa proteína é justificada primeiramente pela aplicação já existente de outras lectinas do seu grupo em formulação de produto para tratamento de feridas (DA SILVA et al., 2004). Além disso a lectina mostrou potencial para aplicação em curativos por estimular a produção de células de defesa, estimular células de defesa a irem ao local da lesão, mostrando-se não citotóxica em concentrações abaixo de 1 mg mL^{-1} às células da pele e estimulou a cicatrização in vitro de células da derme (BRANDO-LIMA et al., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Elaborar e comparar desempenho dos curativos bioativos com a incorporação da frutalina em membranas de celulose bacteriana (CB) e celulose bacteriana oxidada (CBOXI).

2.2 Objetivos específicos

- Produzir membranas de CB natural e oxidada.
- Purificar a frutalina pelo método de cromatografia de afinidade e verificar atividade e pureza dos lotes produzidos.
- Realizar estudo do processo de otimização da incorporação da frutalina nas membranas de biocelulose natural e oxidada variando parâmetros de produção: tempo, temperatura e concentração da lectina.
- Estudar a atividade hemaglutinante da frutalina incorporada nos curativos.
- Determinar as propriedades físico-químicas e morfológicas dos curativos produzidos.
- Avaliar a citotoxicidade e ação na migração *in vitro* de fibroblastos da lectina presente nos curativos.
- Avaliar atividade microbiológica dos curativos produzidos.

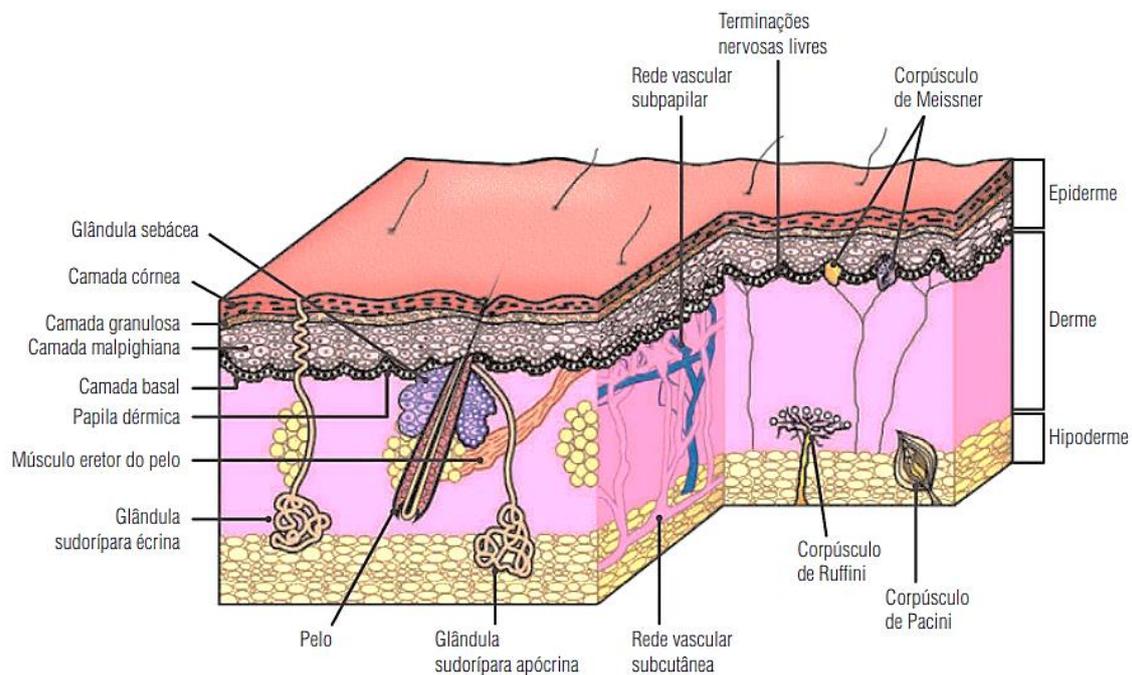
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Esta seção mostra os conhecimentos teóricos coletados para desenvolvimento desse trabalho e compreensão dos mecanismos envolvidos na cicatrização da pele e atuação da lectina como molécula bioativa na matriz de celulose bacteriana.

3.1 Pele

A pele é um órgão do corpo humano, com área de 1,5-2 m², composto por três camadas principais que são a derme, epiderme, subcutis ou hipoderme (LAI-CHEONG; MCGRATH, 2017). A figura 1 representa o perfil da pele humana. Devido a sua grande extensão é o maior órgão do corpo, com organização complexa. Possui função de barreira do corpo contra agressores externos, interface que realiza controle de temperatura do corpo e após uma lesão consegue organizar uma ação de cicatrização recompondo a área atingida (PAUL; SHARMA, 2015).

Figura 1: Camadas da pele humana.



Fonte: Adaptado de (RIVITTI, 2014).

A epiderme é a camada mais superficial, estando em contato direto com o meio externo ao corpo. Ela é composta basicamente de queratinócitos, que são células epidérmicas com uma gama de proteínas como a queratina (ZHONG *et al.*, 2021).

Pode ser dividida em subcamadas: camada germinativa ou basal, responsável pela constante regeneração da pele, por meio de mitose das células; camada espinhosa, consiste em várias fileiras de queratinócitos mais maduros, semelhantes a espinhos; camada granular, consiste em poucas camadas de células com maior concentração de queratina; camada lúcida, consiste em várias camadas de novas células mortas e camada córnea, consiste de células mortas e queratina (PAUL; SHARMA, 2015).

A segunda camada, logo abaixo da epiderme, é conhecida como derme. Nela se encontram vasos sanguíneos e estruturas nervosas, bem como apêndices cutâneos, glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos capilares em uma estrutura elástica fibrosa densa (RIVITTI, 2014).

A hipoderme é considerada um tecido subcutâneo sendo composta por células adiposas (AMBEKAR; KANDASUBRAMANIAN, 2019). Esta camada suporta atividades como a cicatrização em camadas acima dela (CADAU *et al.*, 2017). Funcionalmente, a hipoderme, além de depósito nutritivo de reserva,

participa no isolamento térmico e na proteção mecânica do organismo por traumas e pressões na pele em relação às estruturas mais internas ao corpo (RIVITTI, 2014).

3.2 Cicatrização da pele e tratamento de feridas

A pele atua como a primeira defesa contra agentes estranhos externos ao corpo do ser humano, fazendo parte da imunidade inata (ZHONG *et al.*, 2021). O ataque a microorganismos, que vencem a barreira da pele e adentram ao corpo, começa com o reconhecimento de moléculas dos invasores ativando respostas inatas e as defesas necessárias (MURRAY, PATRICK R; ROSENTHAL, KEN S; PFALLER, 2014).

A cicatrização de uma ferida na pele é um evento muito complexo e dinâmico que envolve várias partes do sistema imune inato, adaptativo e complemento como citocinas (KIM *et al.*, 2021). Esse processo se divide em quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação celular e remodelação dos tecidos.

Feridas na pele pode ser caracterizada pela profundidade, sem perda de tecido (como em cirurgias) ou com perda (em caso de feridas crônicas, queimaduras e traumas) (PAUL; SHARMA, 2015).

O tratamento para o segundo caso é em geral mais demorado, com maiores custos médicos, passando por etapas de cicatrização da derme e depois do epitélio (IDRUS *et al.*, 2014). A cura da ferida é afetada se algum agente intervir no processo não sendo possível completar a cicatrização no fluxo biológico normal, dentre eles corpos estranhos, abrasão física, infecções e fatores sistêmicos (PAUL; SHARMA, 2015). Esses casos clínicos são os de maiores gastos para o sistema de saúde e para o paciente devido ao constante atendimento e necessidade de muitos medicamentos e material para curativo devido as várias trocas.

O uso de curativos é o tratamento mais comum para lesões na pele. Por isso o avanço de estudos para seu melhoramento de curativos na tentativa de diminuir os enormes gastos anuais em todo o mundo (DONG, RUONAN; GUO, 2021). Os curativos podem ser classificados por sua ação em produtos passivos tendo os curativos tradicionais, como os curativos de gazes e tules, que

respondem pelo maior segmento do mercado e produtos bioativos que liberam substâncias ativas na cicatrização de feridas ou possuem matrizes que atuam no fechamento da ferida, como o colágeno e a quitosana (PAUL; SHARMA, 2015).

Curativos passivos tem uma baixa eficiência em feridas crônicas pois não possuem compostos que estimulam a cicatrização, demandam muitas trocas para evitar que se tenha alta proliferação bacteriana no material em contato com a ferida, isso faz com que o tratamento tenha um custo maior (GRUPPUSO *et al.*, 2021). Os curativos de gaze apresentam um grande número de limitações, como não são capazes de agir ativamente nos eventos de cicatrização e podem perder umidade aderindo e ressecando a pele (PAUL; SHARMA, 2015). O uso de curativos umidos pode ajudar na cicatrização. A umidade controlada da pele, hidrata a proteína queratina evitando rachaduras e resultando na plasticidade da camada córnea da epiderme conferido maior resistência física e mecânica ao órgão (FORSLIND, 1994; VASCONCELOS; CUNHA; *et al.*, 2020).

3.3 Curativos bioativos

Os curativos bioativos são promissores pela diversidade de suas matrizes, princípios ativos e suas combinações para aplicação de acordo com a região afetada e gravidade do ferimento da pele (SIKKA; MIDHA, 2019). A combinação desses materiais pode ir associando características de importância para regeneração do tecido lesado como proporcionar um ambiente úmido e na temperatura adequada; estimular a coagulação natural do sangue na área da ferida; promover a propagação celular e migração; ter atividade antimicrobiana; bloquear a terminações nervosas e a dor do paciente (GRUPPUSO *et al.*, 2021). Os materiais bioativos podem atuar nos eventos de inflamação, proliferação ou de remodelação da cicatrização ocasionando crescimento, diferenciação, e funcionamento de células como macrófagos, fibroblastos e queratinócitos (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; STRAMER; MORI; MARTIN, 2007).

Esses curativos devem desempenhar três funções diferentes, para isso pode estar associado com curativos passivos ou ter várias camadas: a primeira é liberar o princípio ativo e evitar a aderência e posterior trauma na remoção; a segunda absorver exsudato em excesso e a última formar uma barreira contra

agentes infecciosos (WELLER; WELLER; TEAM, 2019). Entre os bioativos utilizados para maximizar a eficiência de curativos de base polimérica e estimular a cicatrização estão antioxidantes, substâncias anti-inflamatórias, antibióticos, corticosteroides e peptídeos (BOMBALDI DE SOUZA *et al.*, 2020). Substâncias com essas características estão presentes, por exemplo, em óleos essenciais (LIAKOS *et al.*, 2014), extratos de aloe vera e mel (MOURA *et al.*, 2013), ciprofloxacina (DONG, YANG *et al.*, 2010), ibuprofeno (THU; ZULFAKAR; NG, 2012).

3.4 Matriz de celulose bacteriana

A celulose é um polímero composto de cadeias cíclicas de glicose unidas por ligação covalente. A unidade de repetição do polímero celulose é chamada de celobiose. Pode ser obtida através de diversas plantas e por produto do metabolismo de algumas bactérias. A vantagem do biopolímero adquirido da segunda fonte é a facilidade da purificação e o isolamento com maior eficiência por ser livre de outros polímeros como lignina, pectina e hemicelulose existentes na primeira fonte (GREIL; LIFKA; KAINDL, 1998; PONCE *et al.*, 2021).

Celulose bacteriana (CB) é um polímero natural da classe dos polissacarídeos com formação em camadas, e com arranjo estrutural estabilizado com interação por ligação de hidrogênio entre cadeias em algumas regiões (POGORELOVA *et al.*, 2019). O polímero biocompatível possui resistência à tração (módulo de Young) compatível com a pele (COIMBRA, 2016) que fica entre 4,6 a 20 Mpa (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019) sendo da CB purificada com K_2CO_3 (VASCONCELOS; ANDRADE; *et al.*, 2020) 5.3 MPa, adequadas para aplicações de curativos.

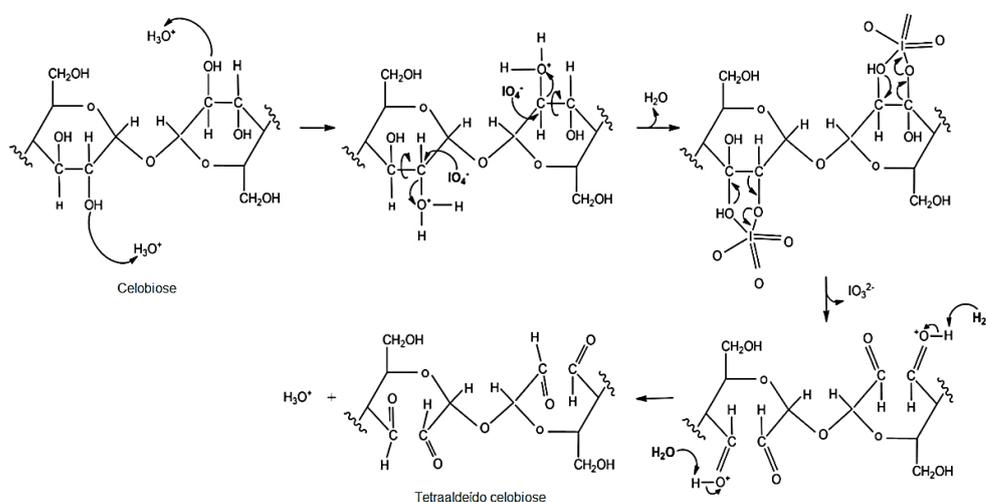
Pode ser produzida por espécies como *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Komagataeibacter*, *Sarcina*, *Acetobacter*, *Rhizobium* e *Salmonella* (ISLAM *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2020). Em particular as da espécie *Komagataeibacter*, chamada anteriormente de *Gluconacetobacter*, são escolhidas devido ao rendimento de produção quando comparado entre *Acetobacter* (LI, JUE *et al.*, 2019). A CB difere da celulose vegetal em relação à estrutura fibrosa, pois apresenta-se essencialmente

nanométrica, além de alta cristalinidade e pureza permitindo eficiente processo de purificação e esterilização para aplicações biomédicas (DUARTE et al., 2019).

O polímero possui é formado por nanofibrilas com hidroxilas disponíveis para reações químicas (GORGIEVA; TRCEK, 2019). Essa matriz suporta tratamentos químicos para maximização de suas propriedades como no caso a oxidação encurtando as fibrilas da estrutura e aumento da porosidade (VASCONCELOS; ANDRADE; et al., 2020). O íon de metaperiodato (IO_4^-) quebra a estrutura cíclica da celobiose gerando quatro grupos aldeídos nas extremidades (NYPELÖ et al., 2021), figura 2.

Com isso a CBOXI é mais disponível para interações ou ligações com bioativos, como no estudo onde uma enzima, a papaína, foi imobilizada covalentemente à membrana com o intuito de se obter um curativo com propriedade de remoção de tecidos necrosados ou debride (VASCONCELOS; CUNHA; et al., 2020). A papaína é uma enzima utilizada em tratamentos de feridas na pele auxiliando no desbridamento químico (DUTRA et al., 2017). Foi realizado o tratamento da CB produzida ao longo de 5 dias de fermentação estática, seguido de purificação com K_2CO_3 selecionada devido à alta porosidade e área superficial e tratada por oxidação com NaIO_4 realizada a 1% (m/v) por 6 h a 55°C com 50% de grau de oxidação e preservando sua estrutura morfológica

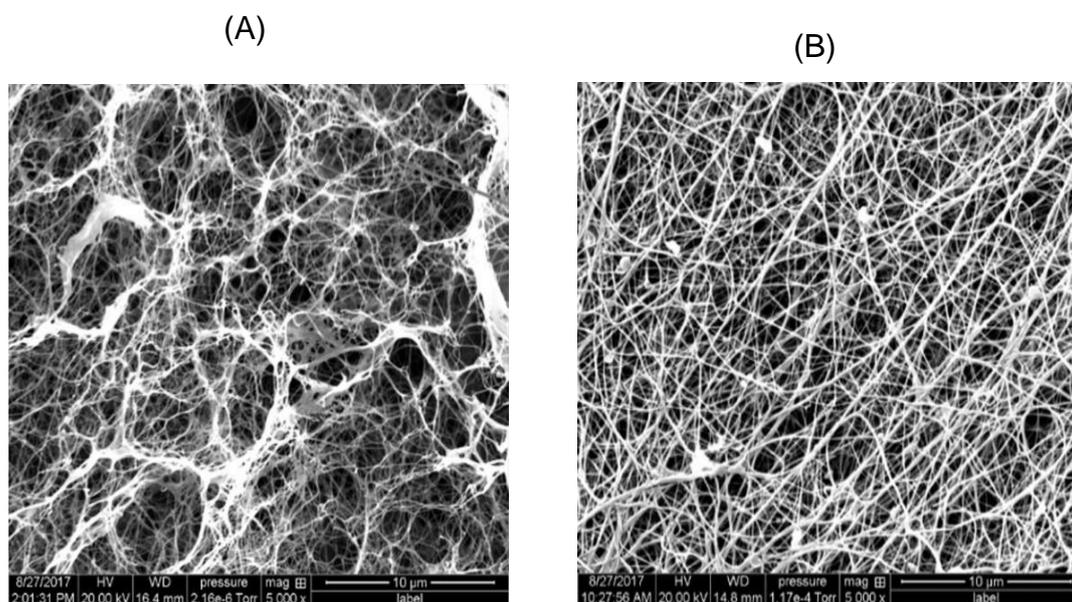
Figura 2: Mecanismo de reação de oxidação da celobiose com metaperiodato de sódio.



Fonte: adaptado de (VASCONCELOS; ANDRADE; et al., 2020)

Essa matriz vem sendo utilizada como suporte para incorporação de diversos bioativos com propriedades antimicrobianas como prata (WU et al., 2018), compostos de amônio quaternário (ZYWICKA et al., 2018) e amoxicilina (CHUAH et al., 2018); propriedades estimuladoras de cicatrização colágeno (DE SOUSA MORAES et al., 2016); ácido hialurônico (LI, YING *et al.*, 2019); enzima como bromelaina (ATAIDE et al., 2017), lisozima (BAYAZIDI; ALMASI; ASL, 2018). A figura 3 ilustra a microscopia eletrônica de varredura (MEV) de uma membrana purificada de CB e da membrana após o processo oxidação por metaperiodato de sódio (CBOXI).

Figura 3: MEV de membranas de (A) celulose bacteriana purificada por solução alcalina e oxidada por metaperiodato de sódio (CBoxi) e (B) celulose bacteriana (CB) somente purificada.



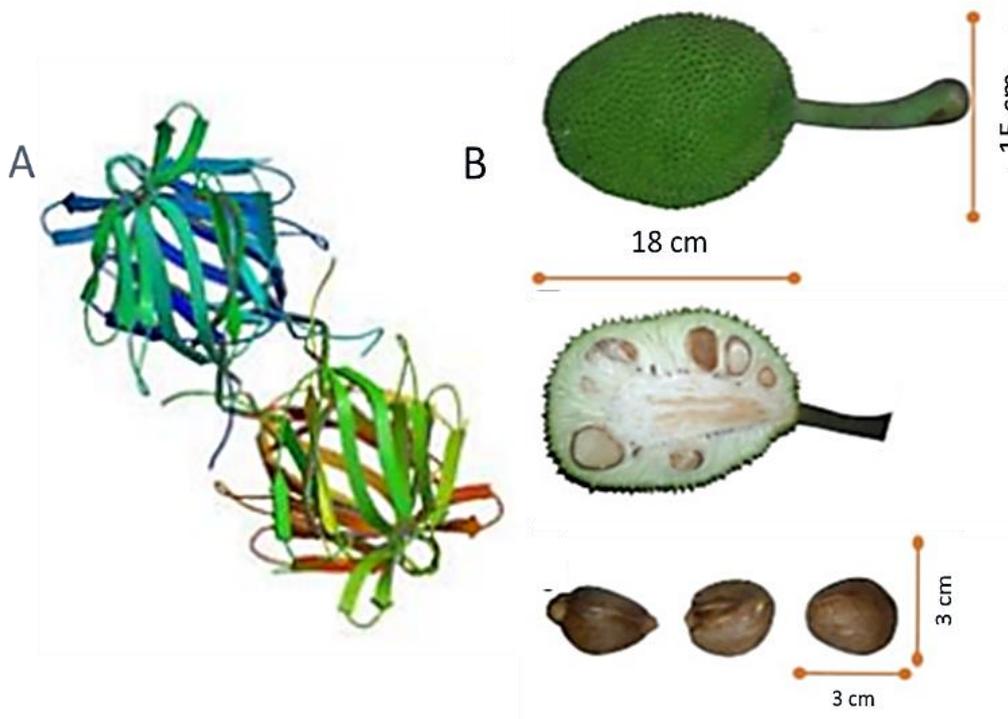
Fonte: VASCONCELOS (VASCONCELOS; ANDRADE; et al., 2020).

3.5 Frutalina: uma lectina da semente de *Artocarpus incisa* L.

As lectinas são proteínas variadas presentes em diversos organismos, como microrganismos, animais e plantas, com uma característica comum que é ligar-se reversivelmente e seletivamente a carboidratos em áreas específicas da

cadeia, os chamados sítios ativos (LAM; NG, 2011; SHARON; LIS, 1989). A frutalina (FTL) pode ser obtida naturalmente da semente da planta *Artocarpus Incisa* L. (MOREIRA et al., 1998). Ela é uma multilectina ligante à α -D-galactose (maior afinidade) e D-manose (menor afinidade), uma glicoproteína que possui cerca de 2% de carboidratos em sua estrutura (LEITE, 2016). Ela está incluída no grupo de lectinas relacionadas a jacalina (lectina da semente da jaca) pela semelhança estrutural (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS et al., 2019). Essa proteína tetramérica apresentou massa molecular 60 KDa em eletroforese nativa (VIEIRA NETO, 2019) apresenta bandas de 12 e 15 KDa no SDS-PAGE, que correspondem a uma fração glicosilada e uma fração levemente ou não glicosilada (LEITE, 2016), representada na figura 4.

Figura 4: (A) Estrutura tridimensional representativa da frutalina. (B) Fruta-pão.

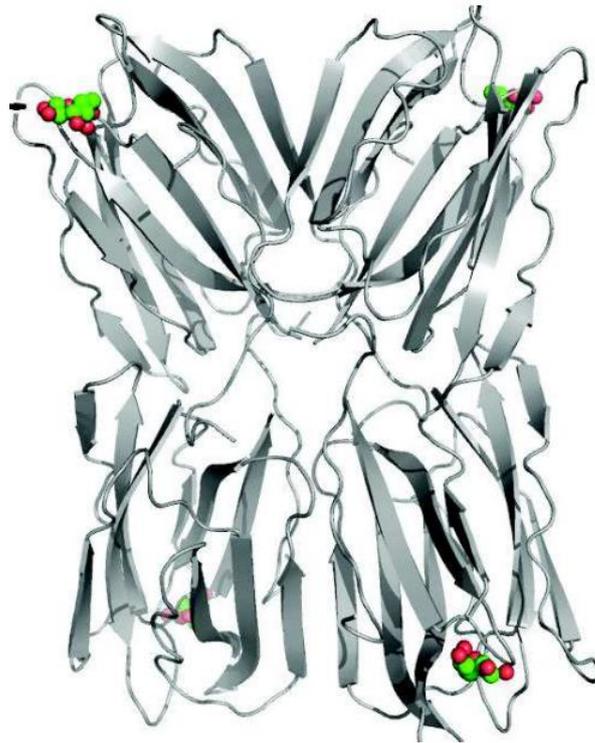


Fonte: Adaptado de (LEITE, 2016; SOUSA, FELIPE DOMINGOS DE., 2018).

A ligação entre FTL e α -D-galactose, representada pela figura 5, ocorre através de pontes de hidrogênio (VIEIRA NETO, 2015). Na purificação da frutalina pode-se usar a cromatografia de afinidade como técnica de separação da proteína do seu extrato. Sua forma recombinante se mostrou estável

principalmente em solução salina, refrigerada ou liofilizada, suportando temperaturas de até 64°C e pH entre 1,0-9,0 (LEITE, 2016). Além disso, os agentes caotrópicos (variações extremas de calor e pH; contato com etanol, metanol, radiações UV) substâncias ou condições que modificam a estrutura da molécula, são capazes de desnaturar lectina (MOREIRA et al., 1998).

Figura 5: Estrutura da frutalina tetramérica ligada a D-galactose (vermelho).

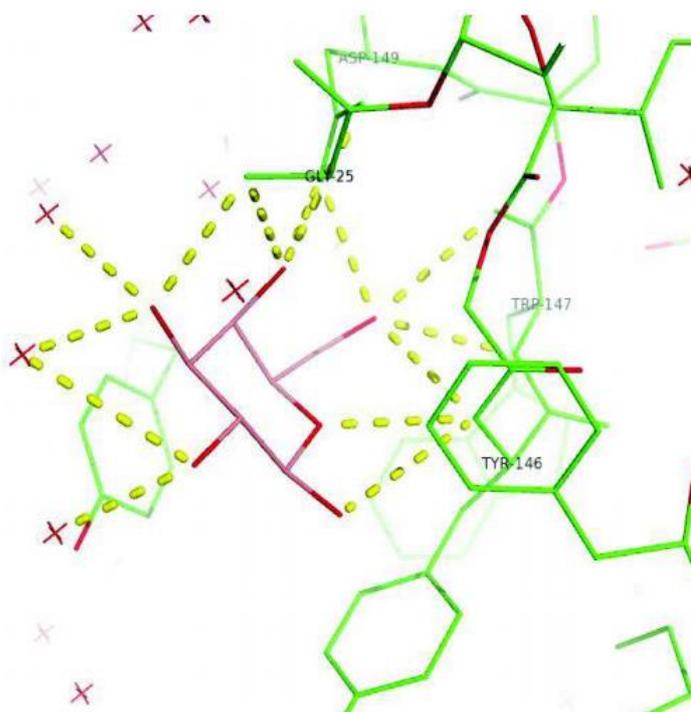


Fonte: (VIEIRA NETO, 2015).

A lectina possui atividade de aglutinar as hemácias do sangue. A sua atividade hemaglutinante ocorre devido a interação da proteína com carboidratos da membrana das hemácias formando uma rede, ocorrendo possibilidade de ligação em até quatro regiões por ser tetramérica, figura 6 (SOUSA, FELIPE DOMINGOS DE., 2018). Esse tipo de atividade não é possível em lectinas monoméricas, pois ocorre impossibilidade de ligação em rede possuindo somente um local de ligação da lectina aos eritrócitos. Glicolipídios, glicoproteínas ou carboidratos das glicoproteínas da superfície celular funcionam como locais de ligação para lectina (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). As lectinas tetraméricas relacionadas ao grupo da

Jacalina possuem a propriedade de hemaglutinação mesmo em concentrações reduzidas, sendo perdida sua atividade pela desnaturação ou mudança irreversível da estrutura (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 6: Sítio de reconhecimento a carboidrato da frutalina em verde; ligante D-galactose em vermelho, pontes de hidrogênio em amarelo e moléculas de água "X" vermelho.



Fonte: (VIEIRA NETO, 2015)

A frutalina se mostrou estável em solução salina NaCl 0,15 M, teor salino semelhante ao do sangue (BRANDO-LIMA et al., 2005; DAMASCENO et al., 2020; LEITE, 2016) ou tampão PBS (ABDON et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2011) sendo usada em suspensão para análises.

Nos últimos anos, tem crescido os estudos em na área imunobiológica com essa lectina por suas excelentes propriedades biológicas (OLIVEIRA et al., 2021). Um exemplo delas é a ArtinM, lectina nativa isolada a partir da semente da Jaca (*Artocarpus integrifolia*) com patente de formulação de pomada com ação cicatrizante (CECÍLIO et al., 2016; DA SILVA et al., 2004), tendo ação protetora com infecção por infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (COLTRI et al., 2008), induz a migração de neutrófilos e auxiliadora da resposta imune e inflamatória pela estimulação da produção de proteínas, chamadas interleucinas,

por células de defesa (CECÍLIO et al., 2016). Além disso, a frutalina mostrou potencial para aplicação em curativos por se apresentar um ativador de neutrófilos e mitogênico de linfócitos humanos (BRANDO-LIMA et al., 2006), foi capaz de induzir a migração de neutrófilos em ratos (CAMPANA et al., 2002) e estimular a migração de fibroblastos in vitro (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS et al., 2019), processos estes que fazem parte das fases de cicatrização da pele. O Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) mostra três registros de pedidos de patente depositados no Brasil em pesquisa utilizando o termo frutalina: uso farmacológico da frutalina, na forma de nanocápsula de quitosana, como analgésico para dor orofacial aguda e neuropática (DAMASCENO et al., 2020); utilização da frutalina nativa no diagnóstico de patologias prostáticas em humanos (MOREIRA et al., 2013).

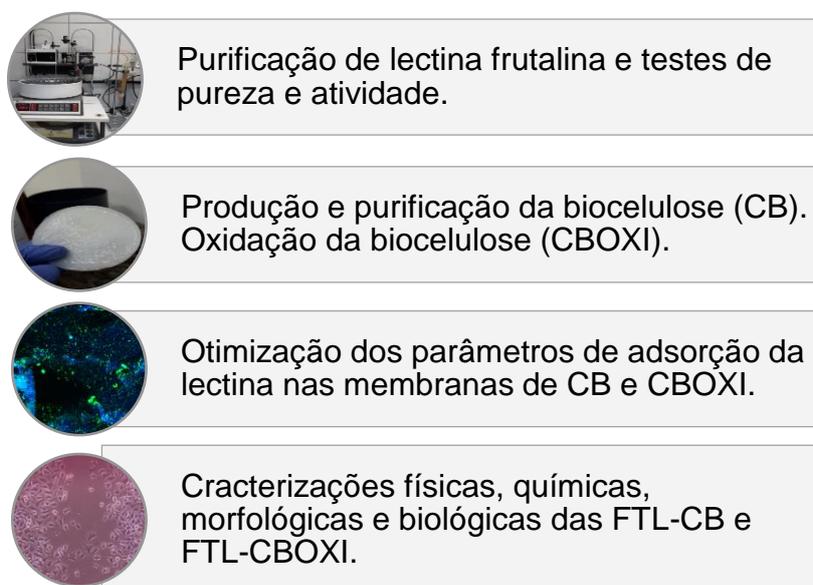
Uma aplicação direta em uma matriz são os experimentos de Sousa et al. (2019) mostrando que dentre as formulações de hidrogel de galactomanana obtida de sementes de *Caesalpinia pulcherrima* com lectinas *Artocarpus incisa* (frutalina), *Artocarpus integrifolia* (jacalina), *Dioclea altissima* (DAL) e *Arachis hypogaea* (PNA) a primeira proteína mostrou potencial para cicatrização de feridas. Dentre as lectinas estudadas somente a frutalina apresentou estimulação da migração de fibroblastos, aumentou a expressão de p-ERK (PERK é uma proteína residente na membrana do retículo endoplasmático (ER) e está ligada ao processamento de insulina) e estimulou a secreção de IL-6 (é uma interleucina que atua como uma citocina pró-inflamatória e uma miocina anti-inflamatória, estimula a imunidade quando há uma ferida como em caso de queimadura) e no teste in vivo foi capaz de fechar uma lesão dérmica em camundongos em 11 dias.

Existe jacalina comercial na forma recombinante em algumas marcas. A frutalina ainda não se tem na forma comercial, mas é possível a sua produção na forma recombinante em laboratório em alta pureza, controle de isoformas e rendimento quando comparado a forma nativa (GARCIA et al., 2021; LEITE, 2016; SOARES-COSTA et al., 2018). A proteína recombinante nada mais é do que proteínas sintetizadas de biomoléculas in vitro, utilizando a técnica de expressão gênica bacteriana, que permite a produção escalonada para aplicações farmacológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção mostra o desenho experimental, figura 7, para estudo da fabricação dos curativos através da adsorção da lectina na matriz de biocelulose e as análises realizadas para a caracterização de propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais produzidos.

Figura 7: Etapas da estratégia experimental.



Fonte: autoria própria.

4.1 Materiais

4.1.1 Sementes para obtenção da frutalina

Os frutos da fruta-pão-de-carço (*Artocarpus incisa* L.) foram coletados entre os meses de maio e junho no município da Pacatuba, Ceará, Brasil. A espécie vegetal utilizada nesse trabalho foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) com registro de número AB94DA1. A poupa foi retirada e usadas somente as sementes. Estas foram lavadas e armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processo para obtenção da farinha para realizar a extração.

4.1.2 Reagentes

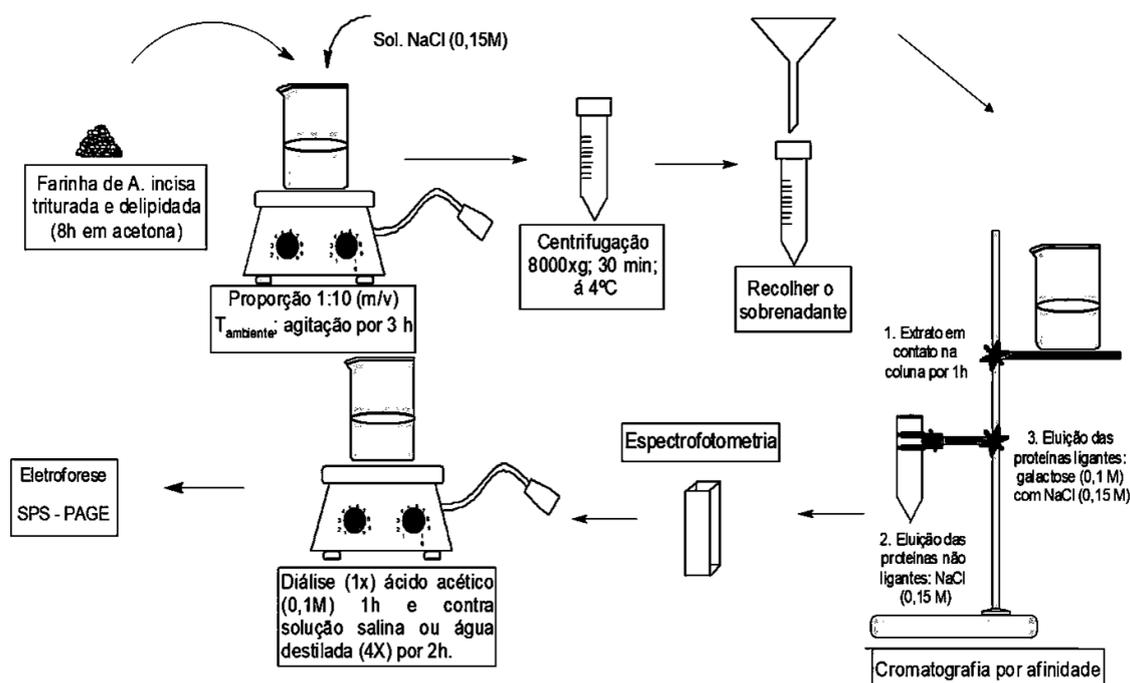
Isocianato de fluoresceína ($C_{21}H_{11}NO_5S$), carbonato de sódio (Na_2CO_3), carbonato de potássio (K_2CO_3), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* e mitomicina C foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). D-galactose ($C_6H_{12}O_6$), Tris (Hidroximetil), Aminometano ($C_4H_{11}NO_3$), acrilamida (C_3H_5NO) e β -mercaptanol (C_2H_6OS) da empresa Amresco Inc. (Sólon, USA). Cloreto de sódio (NaCl), ácido acético (CH_3COOH), persulfato de amônio ($(NH_4)_2S_2O_8$) e azul de bromofenol ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) da Vetec Química Fina LTDA (Duque de Caxias, Rio de Janeiro Brasil). Metanol (CH_3OH), ácido clorídrico (HCl), cloreto de potássio (KCl), etanol (C_2H_6O), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e dimetilsulfóxido (C_2H_6OS) utilizados da DINÂMICA (Indaiatuba, SP, Brasil). Todos em grau analítico, sem prévia purificação.

4.2 Métodos

4.2.1 Purificação da lectina, teste de pureza e atividade hemaglutinante.

O procedimento de purificação está representado na figura 9. As sementes de *A. incisa* foram fragmentadas, delipidadas com acetona por 8 h e secas. Os fragmentos foram triturados em moinho rotatório para obtenção de uma farinha. O extrato bruto foi preparado da mistura da farinha com solução NaCl 0,15 mol/L na proporção 1:10 (m/v) sob agitação (agitador magnético C-MAG HS4, IKA, São Paulo, BR) por 3 h. Depois a mistura foi centrifugada à 8000 g, por 30 min e à 4 °C.

Figura 8: Purificação da lectina de *Artocarpus incisa* L. e análise de pureza.



Fonte: autoria própria.

O sobrenadante foi colocado em coluna de cromatografia de afinidade de agarose-D-Galactose (Sigma) para reter a lectina frutalina e os picos cromatográficos coletados com auxílio de um cromatógrafo (LKB FRAC-100, Pharmacia, Amersham, UK). Após 1 h de contato, a fração não retida foi eluída com NaCl 0,15 mol/L e a retida, com a lectina, com solução de galactose 0,2 mol/L com NaCl 0,15 mol/L. A fração com a frutalina foi dialisada uma vez em ácido acético 0,1 mol/L e quatro vezes em solução NaCl 0,15 mol/L e concentrada em filtro Amicon® Ultra-4 submetido a centrifugação 1000 rpm, à 4 °C em ciclos de 10 minutos.

A dosagem de proteínas foi realizada conforme o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e a presença de proteínas nos eluatos das colunas cromatográficas foi detectada pela absorbância (espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro, GE Biochrom, Amersham, UK) à 280 nm. Alíquotas das amostras foram analisadas por eletroforese SDS-PAGE (Mini-PROTEAN® Tetra Cell 165-8000, BIO-RAD, Califórnia, EUA) para confirmar a presença da lectina. As alíquotas purificadas foram analisadas quanto à atividade hemaglutinante de eritrócitos de coelho, para confirmar a característica reagente da lectina (MOREIRA et al., 1998).

4.2.2 Produção e purificação de CB

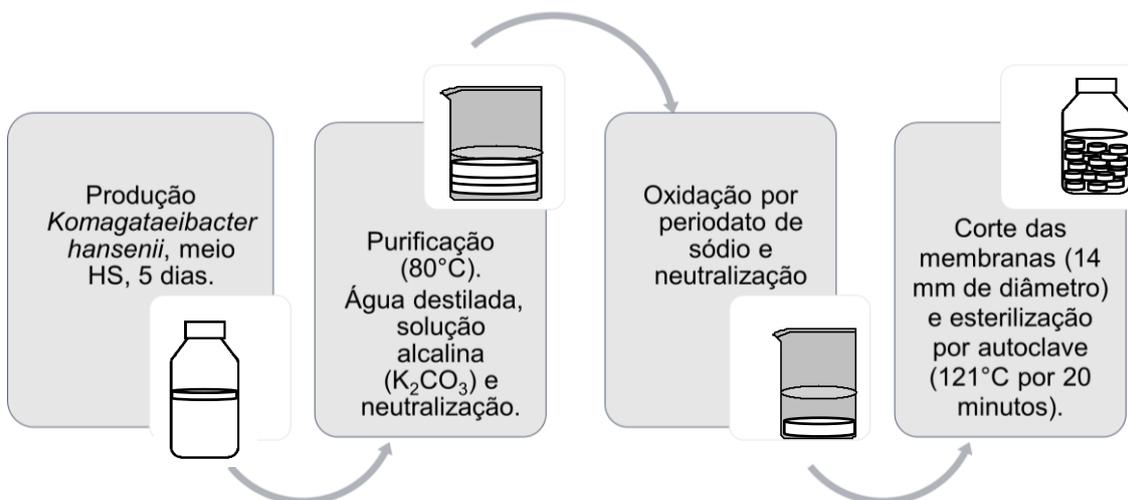
As membranas de (CB) foram produzidas pelo método usado por Vasconcelos (VASCONCELOS; ANDRADE; et al., 2020) em cultivo estático da *Komagataeibacter hansenii* (ATCC 53582) em meio HS (Hestrin and Schramm;1954) composto por 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 1,15 g/L ácido cítrico e 2,7 g/L de Na₂HPO₄. O pH do meio foi ajustado para 5 com adição de ácido cítrico na proporção de 1:1 (v/v), em seguida o meio foi autoclavado (121 °C, 1 atm por 15 min). A fermentação ocorreu em frasco Schott (500 mL) contendo 100 mL de meio HS e 3 mL da cultura contendo a bactéria *K. hansenii* previamente ativada. Os frascos foram incubados em estufa BOD (Q315M25, Quimis, São Paulo, BR) durante 5 dias à 30 °C. Após a produção as CBs foram retiradas do frasco de cultivo e purificadas.

Para a purificação, as membranas foram lavadas duas vezes com água destilada à 80 °C por 1 h. Depois, as membranas foram imersas em uma solução de carbonato de potássio 0,3 mol/L à 80 °C por 1 h. A solução foi descartada e repetido o processo. Após o tratamento alcalino as membranas foram lavadas com água destilada à temperatura ambiente até atingirem pH 7,0. As membranas foram então esterilizadas em autoclave à 121 °C, por 15 min à 1 atm.

4.2.3 Oxidação da CB

Foi utilizada a metodologia aplicada por Vasconcelos (VASCONCELOS; ANDRADE; et al., 2020), representado pela figura 8 juntamente com o processo de produção. As CBs purificadas foram colocadas em solução tampão KCl-HCl com pH 1,0 à 25 °C por 24 h. Após esse tempo as membranas foram retiradas da solução e colocadas em béquer, individualmente, na proporção mássica de CB seca por metaperiodato de sódio (1,0 g/1,5 g) e imersas em uma tampão fresco (a cada 0,356 g de CB seca/50 mL de tampão. As CBs ficaram em incubadora shaker por 6 h à 55 °C com agitação orbital (125 rpm) sob ausência de luz. Após o período de incubação, foi adicionado 12 mL de etilenoglicol e agitado por 1 h, para consumir o restante do metaperiodato de sódio e parar a oxidação. As membranas oxidadas (CBOXI) foram lavadas com água destilada até alcançarem pH 7,0 e esterilizadas em autoclave (121 °C, 15 min, 1 atm).

Figura 9: Processo de produção e oxidação da membrana de CB.



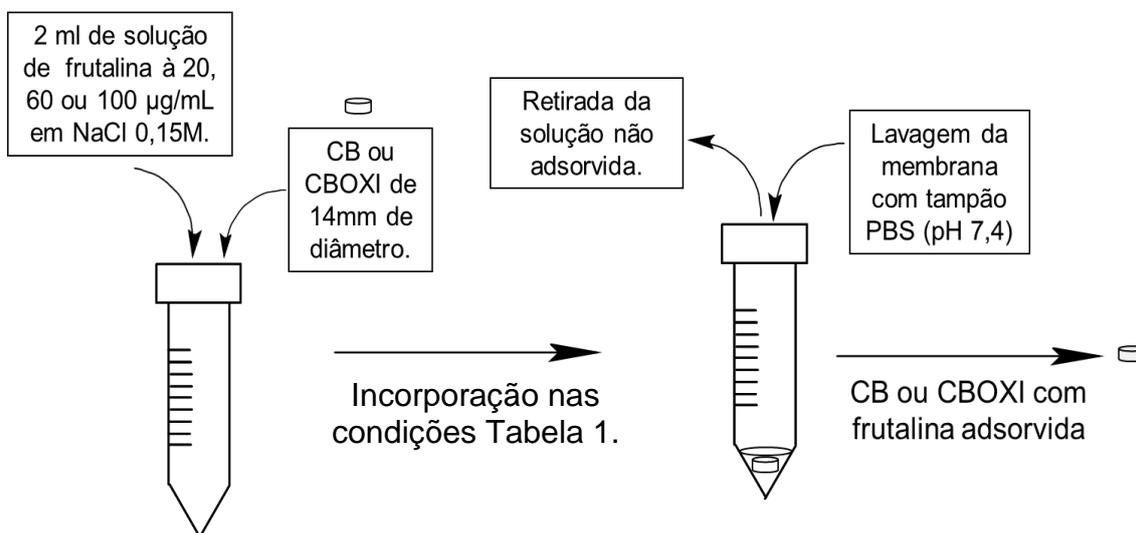
Fonte: autoria própria.

4.2.4 Adsorção da lectina nas membranas

As membranas foram esterilizadas previamente em autoclave (121 °C, por 20 min) em solução de NaCl (0,15 mol/L). A lectina purificada e dialisada foi filtrada, quantificada e diluída nas concentrações do planejamento experimental. Os ensaios foram realizados levando em conta as proteínas suspensas não contando com as precipitadas. Para isso, foram armazenadas em concentração acima da desejada realizada a filtração em filtro de seringa 0,22 μ m e quantificada a dosagem de proteínas da solução para maior certeza da concentração.

Foram realizadas incorporação em CB e CBOXI com o intuito de comparar qual matriz pode reter mais lectina. Para a adsorção foram adicionados 2 mL da solução de lectina, quantidade suficiente para cobrir um disco de 14 mm de diâmetro de CBOXI ou CB, em tubo Falcon de 50 mL, e mantido em incubadora shaker com agitação orbital de 100 rpm, como mostrado na Figura 10.

Figura 10: Processo de adsorção de frutalina nas membranas de biocelulose (CB) e biocelulose oxidada (CBOXI).



Fonte: autoria própria.

Passado o tempo de acordo com o planejamento experimental, a solução foi removida e as membranas lavadas rapidamente com 1 mL de PBS (pH 7,4) para a remoção das moléculas superficiais de lectina. Os controles sem frutalina receberam a lavagem da mesma forma para padronização entre amostras e controles. As membranas com o princípio ativo foram usadas logo após imobilização juntamente com seus controles.

O cálculo da variável dependente rendimento de incorporação comparando as leituras de absorvância foi realizado de acordo com a Equação 1 utilizando a quantificação de proteínas, pelo método de Bradford, da solução inicial ($Abs_{FTL\ TOTAL}$), solução não adsorvida ($Abs_{FTL\ RESTANTE}$) e da lavagem com tampão PBS ($Abs_{FTL\ PBS}$).

$$R (\%) = \left(\frac{Abs_{FTL\ TOTAL} - Abs_{FTL\ RESTANTE} - Abs_{FTL\ PBS}}{Abs_{FTL\ TOTAL}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

4.2.4.1 Planejamento experimental da adsorção da lectina nas membranas CB e CBOXI

Para estudar o rendimento de incorporação, foram escolhidas três variáveis independentes para imobilização da proteína na CBOXI e CB: temperatura, tempo de imobilização e concentração da proteína em solução de NaCl 0,15 M ($\mu\text{g/mL}$). A matriz experimental foi organizada obedecendo um planejamento de 2^3 , apresentada na Tabela 1, com nível superior (+) e outro inferior (-) somando a triplicata no ponto central (0) totalizando 11 tipos de experimentos para cada tipo de membrana.

Tabela 1: Níveis das variáveis independentes estudadas do planejamento experimental.

Variáveis	-1	0	+1
Concentração frutalina em solução NaCl 0,15 M (m/v)	20 $\mu\text{g/mL}$	60 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
Temperatura de imobilização	5 °C	15 °C	25 °C
Tempo de imobilização	6 h	15 h	24 h

A concentração máxima foi baseada em estudos anteriores e foi feito um teste de citotoxicidade com a proteína solubilizada, a faixa inferior foi levada em conta a questão de detecção da quantificação da proteína por métodos que se tem disponível. O tempo de imobilização foi o segundo parâmetro em questão de produção do curativo, com máxima de 24 h e mínima de 6 h tendo o ponto central replicado em 15 h. A temperatura máxima foi de 25 °C como temperatura comum em processos produtivos com biomateriais, mínima de 5 °C que seria uma de melhor preservação de proteína apesar de um gasto energético maior para manter essa temperatura. Os controles foram submetidos aos mesmos processos das amostras diferindo que não foi adicionado a lectina frutalina em nenhuma etapa.

Tabela 2: Matriz do planejamento experimental comum entre CB e CBOXI.

Amostra	Concentração frutalina (μg lectina / mL solução)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de imobilização (h)
1	20	5	6
2	100	5	6
3	20	25	6
4	100	25	6
5	20	5	24
6	100	5	24
7	20	25	24
8	100	25	24
9	60	15	15
10	60	15	15
11	60	15	15

4.2.5 Técnicas de caracterização dos curativos FTL-CB e FTL-CBOXI.

4.2.5.1 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).

As amostras CB e CBOXI adsorvidas de lectina em água destilada, no lugar de solução salina para evitar interferência de cristais de NaCl, e os controles foram liofilizadas (Liotop - L101). O ensaio foi feito na Embrapa Agroindústria Tropical para analisar as ligações presentes nas amostras. O ensaio de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR) foi realizado em espectrofotômetro Cary 630, Agilent Technologies coletadas em 100 varreduras com espectros entre 800 e 4000 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O ensaio foi feito na Central Analítica da UFC para observar mudanças visuais na estrutura pela inserção da lectina frutalina. As amostras de CB e CBOXI adsorvidas de lectina em água destilada e os controles foram liofilizadas (Liotop - L101), colocadas em “stubs” e metalizadas com prata (Polaron SC500 Sputter Coater, FISON Instruments, Ipswich, UK). As imagens geradas por Microscopia eletrônica de varredura Quanta 450/FEG-FEI 15kV sob vácuo.

4.2.5.3 Microscopia de Fluorescência Confocal

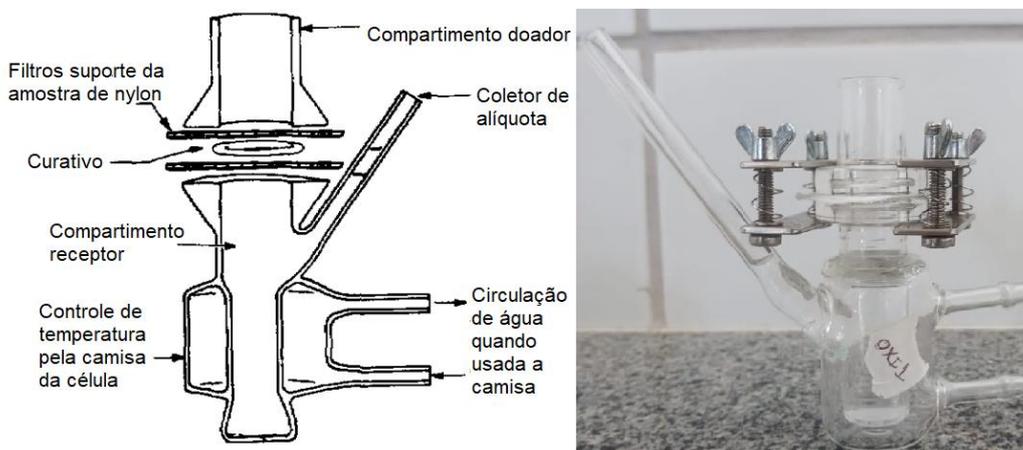
O ensaio foi realizado para observação qualitativamente da incorporação da FTL na membrana úmida. Foi realizada a marcação da proteína com isocianato de fluoresceína (FITC) e posterior imobilização da lectina em membranas CB e CBOXI. Para marcação, a frutalina (1 mg/mL) foi adicionada em tampão de inibição do sítio ativo, carbonato de sódio 100 mM, pH 9, com D-galactose 1M, incubada por 1h à 37 °C. Em seguida, foi adicionado 250 µl de FITC (500 µg/mL) solubilizado em DMSO e incubado sob agitação por 8h à 4 °C protegido da luz e ao final adicionado 450 µl de PBS pH 7,4. Para separação de FITC não conjugado à lectina foi usada cromatografia de exclusão (coluna PD 10 com Sephadex® G-25 Medium, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) equilibrada com PBS pH 7,4. Foi realizada leitura das frações nas densidades óptica de 280 nm para identificar pico cromatográfico I que contém o complexo lectina-FITC e 495 nm para o pico cromatográfico II somente FITC. Para a quantificação da concentração de proteínas de complexos frutalina-FITC optou-se por utilizar o método de Bradford. Foram obtidas imagens superficiais por Microscopia Óptica Confocal (LM710-Confocal, Zeiss), na Central Analítica da UFC, para visualização das amostras.

4.2.5.4 Ensaio de liberação em célula de difusão tipo Franz

Estudos de liberação *in vitro* do bioativo foram realizados utilizando-se uma célula de difusão vertical do tipo Franz, Figura 11, com capacidade de 10 mL e 1,8 cm² de área de difusão. O sistema foi montado, seguindo a Figura 11 colocando filtros de nylon 150 µm (SefarFiltration, EUA) acima e abaixo do curativo que fica entre o compartimento doador, parte de cima, e compartimento receptor, parte de abaixo, mantidas juntas por um grampo de metal. O compartimento do receptor foi preenchido com solução de tampão PBS (pH 7,4). A concentração homogênea no receptor foi mantida colocando as células com a amostra em shaker (SL 222, SOLAB) à 37 °C, com agitação orbital de 100 rpm. O ensaio foi realizado em triplicada para OXI 6 e CB 6. Amostras do fluido (1 mL)

foram coletadas periodicamente a partir da porta de amostragem e monitorada o valor da leitura de absorbância à 280 nm e 1mL de tampão novo foi adicionado ao receptor.

Figura 11: Esquema da montagem da célula de difusão de Franz.



Fonte: Adaptado de (FRANZ, 1975).

A concentração da lectina (c), calculada pela Lei de Beer-Lambert na Equação 2, pode ser estimada pela leitura da absorbância (A) em uma cubeta com lateral (l) de 1 cm, na razão 1:2, pois o coeficiente de extinção molar (ϵ) é aproximadamente 2 (MENDONÇA, 2013; NICK; GRAY, 1995; OLIVEIRA et al., 2021). Os tempos de coleta foram de 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h e 48 h após a montagem do sistema.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Equação 2}$$

O cálculo da taxa percentual de liberação do composto em tampão foi realizado considerando a correção de diluição a cada alíquota retirada para análise. A liberação de compostos de uma membrana é comumente analisados através de funções empíricas e semi-empíricas (MIRCIUIU et al., 2019). Foram comparados dois modelos de liberação. O primeiro é representado pela Equação 3 de Korsmeyer-Peppas descrevendo o percentual acumulado de frutalina liberada de CB em relação à massa inicial da lectina no curativo.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad \text{Equação 3}$$

A massa de lectina liberada no tempo t é M_t e a massa de droga liberada conforme o tempo se aproxima do infinito é M_∞ . A constante k de Korsmeyer-Peppas incorpora as características do sistema de rede macromolecular e da droga.

Outro modelo foi o de Takeru Higuchi, válido para estudar a liberação de fármacos dispersos em matrizes semissólidas (pomadas) e/ou sólidas, considerando um excesso de fármacos não dissolvidos (dispersos) e assumindo que o mecanismo de liberação se dá por difusão das partículas no meio (GOMES FILHO, 2020). . A Equação 4 representa o modelo de Higuchi.

$$Q = Kt^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde: Q é a quantidade de princípio ativo, K é a constante de dissolução de Higuchi, que descreve a liberação do princípio ativo como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo t (LOPES; LOBO; COSTA, 2005). O R^2 da equação obtida nos perfis de liberação foi comparado e utilizada a que mais se enquadrava, no caso Korsmeyer-Peppas.

4.2.5.5 Hemaglutinação dos extratos de membranas em tampão PBS pH 7,4

A FTL nativa solubilizada em solução de NaCl 0,15 mol/L possui atividade hemaglutinante, como característica da proteína (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS et al., 2019). O intuito do teste foi verificar se a proteína liberada do curativo em solução conservava essa propriedade da lectina, não havendo alterações nos sítios de ligação a carboidrato. Membranas CB e CBOXI com lectina adsorvida foram colocadas em 1mL PBS (pH 7,4) por 24 e 48 h, mantidas à 5 °C. As alíquotas de PBS foram testadas em triplicata em hemácias de sangue de coelho albinos, adultos e sadios (alíquotas cedidas pelo biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.).

4.2.5.6 Avaliação da citotoxicidade da frutalina e dos curativos

As células utilizadas foram fibroblastos de camundongos (linhagem L929) e queratinócitos humanos (HaCat) cultivadas em frasco de cultura celular 75 cm² com *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SBF) e contendo 1 % (v/v) antibiótico penicilina-estreptomicina e acrescentado 1 % (v/v) de piruvato de sódio para HaCat. A citotoxicidade das membranas CB e CBOXI com frutalina adsorvida foi avaliado pelo método indireto e comparado com solução da frutalina em NaCl 0,15 M (100 µg/mL) diluída em meio de cultura em diluição seriada até 6,25 µg/mL. Os extratos dos curativos foram produzidos deixando as membranas com frutalina em contato com o meio de cultivo de cada linhagem (sem SBF) por 24 h. Após esse período, os extratos foram coletados e suplementados com 10% de SBF. Para os ensaios, as células de cada linhagem foram semeadas nos poços pela adição de 100 µl da suspensão celular na concentração de 6x10⁴ células/mL em placas de 96 poços por 24 h e incubadas à 37 °C e 5% de CO₂. Após este tempo foi removido o meio de cultura e colocado 100 µl dos extratos dos curativos previamente produzidos. No caso, do ensaio com a frutalina em suspensão de NaCl 0,15 mol/L, foi adicionado nos poços com as células aderidas, as soluções da frutalina nas diferentes concentrações diluídas em meio de cultivo. Depois de 24 e 48 h o sobrenadante foi removido e foram adicionados 120 µl solução resazurina 1% em DMEM. Após 4h, 100 µl do meio metabolizado de cada poço foi transferido para uma nova placa de poços lida em um leitor de microplaca (SpectraMax i3x, Molecular Device, Sunnyvale, USA) no modo fluorescência (λexcitação = 560 nm e λemissão = 590 nm). O cálculo de viabilidade celular foi realizado de acordo com a Equação 5,

$$\text{Viabilidade (\%)} = \left(\frac{F_{\text{Amostra}} - F_{\text{Extrato}}}{F_{\text{Controle}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

As fluorescências são respectivamente: F_{Amostra} do poço com amostra em contato com as células, F_{Extrato} poço com extrato sem células e F_{Controle} poço com células em contato com DMEM suplementado com 10 % (v/v) de soro

fetal bovino (SBF) e contendo 1 % (v/v) antibiótico penicilina-estreptomicina e acrescentado 1 % (v/v) de piruvato de sódio para HaCat.

4.2.5.7 Migração de fibroblastos

Uma alíquota de 1 mL de suspensão de células L929 em meio de cultura na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL foi adicionado em cada poço em uma placa de 24 poços que foi incubada durante 24h em estufa à 37 °C (5% CO₂ / 95% de umidade) para adesão e crescimento celular até atingir confluência de 100%. Passadas as 24h o meio sobrenadante foi retirado, usada Mitomicina C (10 µg/mL) para inibir a mitose celular. Foi adicionada 1 ml de solução de Mitomicina C (em DMEM sem soro) e a placa incubada a 37 °C por 2h. A solução de agente citostático foi removida e feita uma lavagem com tampão PBS. Foi feita uma lesão artificial que é um risco (*scratch*) na direção vertical, radial ao centro do fundo de cada poço com ponteira de plástico de 200 µL estéril. Em seguida, cuidadosamente, foram feitas três lavagens com 500 µL de PBS pH 7,4 para retirada de células desprendidas. Após retirada do PBS foi adicionado 1mL de extrato das amostras de biocelulose (CB) e biocelulose oxidada (CBOXI) contendo a lectina. A análise foi realizada em duplicata para cada amostra e com o controle com meio de cultura. Com auxílio de uma linha guia ao fundo externo da placa, perpendicular a lesão artificial, foram tiradas fotografias sempre na mesma região com câmera digital acoplada ao microscópio invertido (Nikon) nos tempos de 0, 6, 12, 18 e 24 h após a adição do extrato. A área de *scratch* das fotos nos tempos indicados foi avaliada pelo *ImageJ* e a taxa calculada pela Equação 6 (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

$$\begin{aligned} & \text{Taxa de migração (\%)} \\ & = \left(\frac{\text{Distância entre a ranhura (0h)} - \text{distância entre a ranhura (Nh)}}{\text{Distância entre a ranhura (0h)}} \right) \times 100 \end{aligned} \quad \text{Equação 6}$$

4.2.5.8 Ensaio microbiológico qualitativo

As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 11303) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram usadas no ensaio pelo método de disco-difusão em ágar Müller-Hinton. As cepas foram ativadas em Caldo Mueller Hinton (K25-610034, Kasvi) por 24 h à 37 °C. Depois os falcons com as bactérias foram centrifugados, removido o sobrenadante e ressuspendido em novo meio. A concentração foi ajustada com auxílio da leitura da absorbância em espectrofotômetro à 620 nm resultando em uma suspensão de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL para cada tipo de bactéria. Foi adicionado 100 µl da suspensão na placa da petri com ágar Müller-Hinton e espalhado por esfregaço e, em seguida, colocados os discos dos biocurativos sobre o meio de cultivo. As placas permaneceram em incubadora por 24 h à 37 °C e feita a captura de imagens para registrar o observado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este tópico apresenta a discussão e tratamento de dados coletados a partir dos experimentos.

5.1 Análise experimental

A disposição de amostras com as três variáveis independentes para estudo é mostrada na tabela 3 para CBOXI. Os controles só são submetidos a duas variáveis independentes, temperatura e tempo de exposição as respectivas temperaturas em solução salina, gerando um total de controles em 4 condições diferentes somado a condição da triplicata no ponto central. Como variável resposta se teve rendimento de incorporação da frutalina no curativo (%) expresso em relação de quantidade de frutalina em uma solução inicial que forma imersas CB e OXI. As amostras com maiores rendimentos de incorporação foram CBOXI-FTL 1 ($44,96 \% \pm 1,34$) e CBOXI-FTL 6 ($23,28 \% \pm 1,43$), Tabela 3. Da mesma forma, CB-FLT 1 e CB-FTL 6 também produziram maiores rendimentos de incorporação de $21,71\% \pm 1,57$ e $16,91\% \pm 1,05$, Tabela 4.

Tabela 3: Matriz do planejamento 2³ para celulose bacteriana oxidada (CBOXI).

Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de imobilização (h)	FTL incorporada ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Rendimento (%)
CBOXI-FTL 1	20	5	6	5.5	44.96 \pm 1.34
CBOXI-FTL 6	100	5	24	14.3	23.28 \pm 1.43
CBOXI-FTL 2	100	5	6	13.9	22.62 \pm 1.31
CBOXI-FTL 4	100	25	6	13.0	21.13 \pm 1.49
CBOXI-FTL 10	60	15	15	6.8	11.02 \pm 2.90
CBOXI-FTL 9	60	15	15	6.3	10.19 \pm 2.66
CBOXI-FTL 11	60	15	15	6.1	9.92 \pm 2.52
CBOXI-FTL 3	20	25	6	5.7	9.30 \pm 2.33
CBOXI-FTL 7	20	25	24	0.0	0.00 \pm 8.22
CBOXI-FTL 5	20	5	24	0.0	0.00 \pm 3.55
CBOXI-FTL 8	100	25	24	1.3	2.12 \pm 0.76

De forma similar, foi desenhado o arranjo experimental para CB, detalhado na tabela 4, com o intuito de comparar os dois tipos de membranas.

Tabela 4: Matriz do planejamento 2³ para celulose bacteriana (CB).

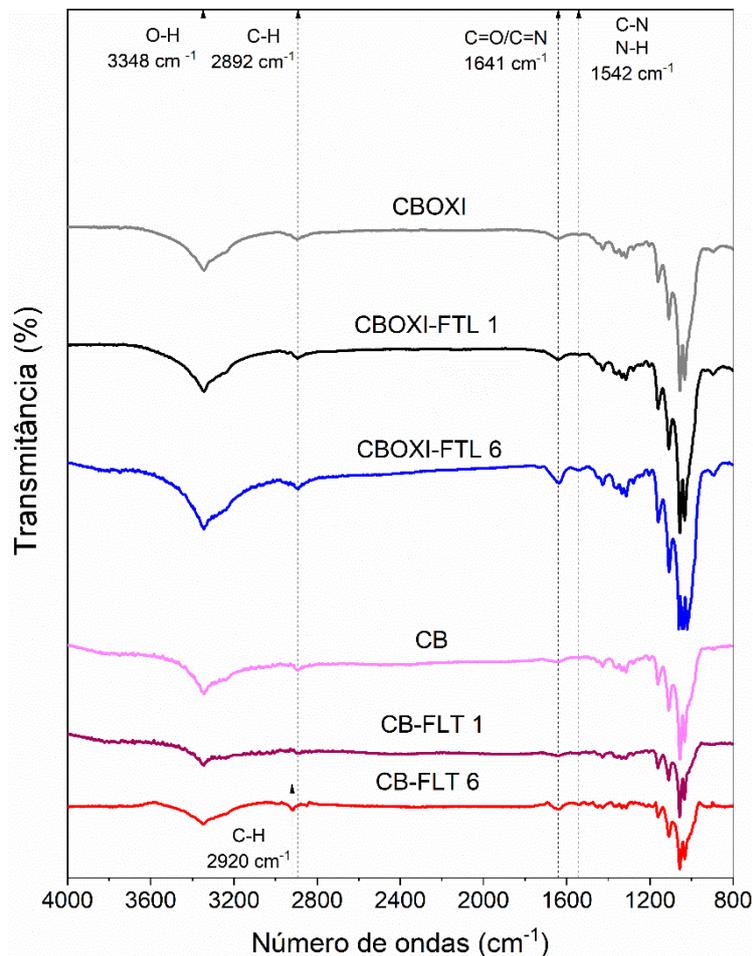
Amostra	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de imobilização (h)	FTL incorporada ($\mu\text{g cm}^{-2}$)	Rendimento (%)
CB-FTL 1	20	5	6	2.66	21.71 \pm 1.57
CB-FTL 6	100	5	24	10.37	16.91 \pm 1.05
CB-FTL 3	20	25	6	2.07	16.67 \pm 1.07
CB-FTL 2	100	5	6	6.42	10.47 \pm 0.35
CB-FTL 5	20	5	24	0.54	4.44 \pm 3.14
CB-FTL 4	100	25	6	3.23	5.26 \pm 2.10
CB-FTL 7	20	25	24	0.68	5.56 \pm 1.57
CB-FTL 11	60	15	15	0.91	2.48 \pm 1.17
CB-FTL 9	60	15	15	0.76	2.07 \pm 0.58
CB-FTL 10	60	15	15	0.46	1.24 \pm 0.58
CB-FTL 8	100	25	24	0.033	0.55 \pm 0.35

A temperatura máxima escolhida teve como base temperatura ambiente comum em processos industriais, visando otimização de custos energéticos (PATIL; REAGAN; BOHARA, 2020) energéticos e a máxima em que a frutalina apresenta conformação estável, tanto para a recombinante como para a nativa se mostrou próximo de 60 °C solubilizada em solução de NaCl 0,15 mol/L (CAMPANA et al., 2002; LEITE, 2016). O tempo de imobilização máximo escolhido foi de 24 h semelhante ao usado por Vasconcelos e colaboradores na imobilização da enzima papaína em CBOXI e CB (VASCONCELOS; CUNHA; et al., 2020). As concentrações de proteína em solução tiveram como referência a concentração mínima em que ocorreu hemaglutinação de eritrócitos de sangue de coelho (sendo testado até concentração de 0,16 µg proteína/mL de solução), conseqüente teste de citotoxicidade nas concentrações escolhidas e baseado em estudo de Sousa e colaboradores que testando o híbrido frutalina/galactomanana concluiu que concentrações próximas de 100 µg de frutalina/g de hidrogel pode apresentar bons resultados para a finalidade de aplicação do material em feridas cutâneas (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS et al., 2019).

A análise de Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR-ATR) nos permite identificar grupos funcionais que foram as ligações na estrutura das amostras e mostrar estruturar semelhantes da CB e CBOXI entre as que foram produzidas e as descritas por Vasconcelos e colaboradores (VASCONCELOS; ANDRADE; et al., 2020). As ligações características da CBC e OXIC são vistas na figura 12 já foram identificadas antes para esse biopolímero, com as posições dos modos vibracionais em 3348 cm⁻¹ alongamento das hidroxilas O-H, 2892 estiramento simétrico de C-H e no intervalo de 1000 a 1600 cm⁻¹ relacionadas as ligações C-H da celulose (LUZ, ERIKA PATRICIA CHAGAS GOMES et al., 2020). Como forma de confirmar a oxidação é possível ver a banda vibracional 1650 cm⁻¹, referente a ligação C=O abundante após a oxidação (VASCONCELOS; ANDRADE; et al., 2020). Foi realizado o ensaio também com os curativos com frutalina para verificar se haveria mudança nas bandas vibracionais. Ocorreu o evento de aumento da banda vibracional referente a ligações O-H nas amostras OXI 6, CB 6 e mais suave nas menores concentrações de FTL, OXI 1 e CB 1. A presença da FTL na amostra OXI 6 mostra aumento próximos a banda referente às ligações C=O/

C=N, no estudo de Sousa e colaboradores realizaram o ensaio para frutalina aparecendo bandas vibracionais próximo à 3250 cm^{-1} (grupo OH da carboxila dos aminoácidos da proteína), 2920 cm^{-1} relacionados grupos CH_2 e na membrana de hidrogel de galactomanana com FTL 825 cm^{-1} relacionados a forma α e β e 867 cm^{-1} relacionados a ligações glicosídicas indicando a presença de unidades α -D-galactopiranosose e β -D-manopiranosose (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS et al., 2019).

Figura 12: Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR-ATR). Das amostras de com controle sem frutalina, CBOXI e CB, e das amostras com a lectina, CBOXI-FTL 6, CBOXI-FTL 1, CB-FTL 6, CB-FTL 1.

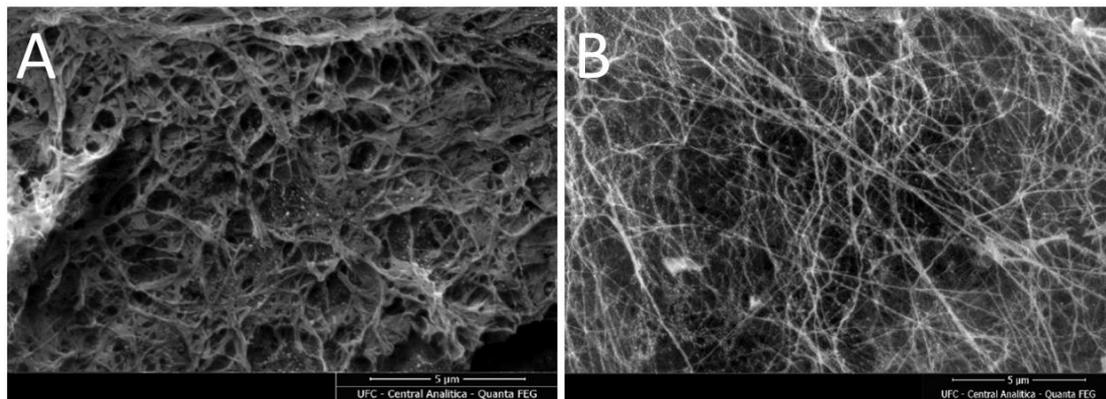


Fonte: autoria própria.

A fim de avaliar visualmente a estrutura das membranas com frutalina adsorvida, o teste de microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 2000X foi realizado. A Figura 13 mostra a estrutura de camadas porosas semelhante a

obtida por Vasconcelos *et al* (VASCONCELOS; ANDRADE; *et al.*, 2020). A estrutura da CBOXI é caracterizada pelos poros com maiores diâmetros do que da CB ocasionado pelo encurtamento das fibras celulósicas por conta reação química (FAVI *et al.*, 2016; LUZ, ERIKA PATRICIA CHAGAS GOMES *et al.*, 2020). A CB possui uma malha mais fechada de nanofibrilas em múltiplas camadas que formam a membrana.

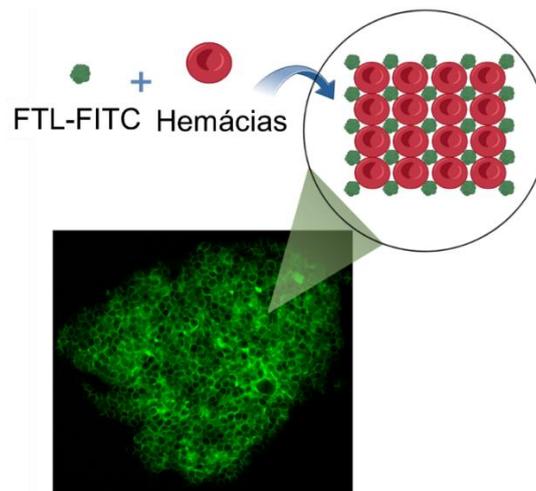
Figura 13: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para os curativos OXI 1 (A) e CB 1 ambas com frutalina (B).



Fonte: autoria própria.

Para confirmar a adsorção da frutalina na CB e CBOXI foi realizado o teste de Microscopia de Fluorescência Confocal. Ocorreu a marcação da frutalina com o FITC, um fluoróforo que emite colocação na região do verde formando um complexo fluorescente. O FITC tem preferência por ligações a grupos amino terminais, amins primárias e sulfidrilas presentes em proteínas. A frutalina não emite fluorescência, por isso a necessidade de marca-la com FITC. A fluorescência da lectina foi observada em uma coloração diferente da biocelulose. Em um primeiro momento se realizou um teste branco com preparo de uma lâmina permanente para verificar se a lectina marcada continuava com sua atividade hemaglutinante e foi capturada a figura 1, com células em forma de rede hemaglutinadas pelo complexo frutalina-FITC.

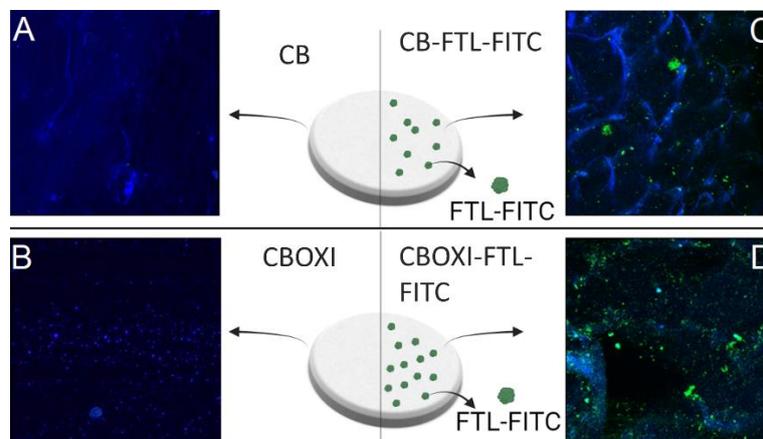
Figura 14: Células de eritrócitos hemaglutinadas com frutalina-FITC.



Fonte: autoria própria.

Então observando os curativos na figura 15 é possível ver a incorporação de FTL pela emissão da fluorescência na cor verde na Figura 15 para (C) BCOXI-FTL-FITC e (D) CB-FTL-FITC. Quando comparado aos controles CB (A) e CBOXI (B) sem frutalina vemos a diferença, pois somente os polímeros possuem uma coloração azulada. É visualizada maior intensidade da fluorescência no curativo CBOXI-FTL-FITC do que em CB-FTL-FITC.

Figura 15: Imagens digitais do ensaio de microscopia de fluorescência confocal. Neste ensaio a FTL foi previamente ligada ao FITC, um fluoróforo, e então incorporada as membranas de biocelulose. A Figura mostra CB (A) e CBOXI (B) que são sem FTL e CB-FTL-FITC (C) e CBOXI-FTL-FITC (D) com FTL, respectivamente.

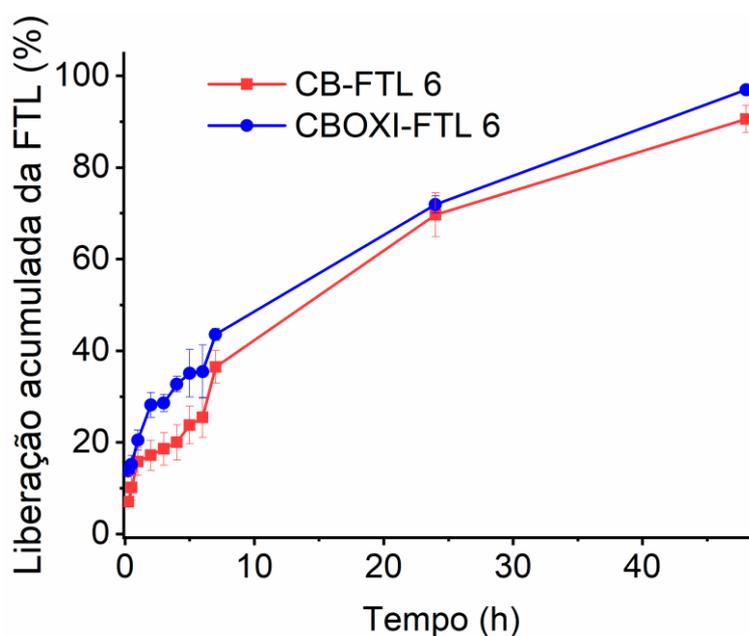


Fonte: autoria própria.

A entrega do fármaco se baseia no princípio natural e espontâneo em que ele passa da região mais concentrada, no caso o curativo, para a menos concentrada que é superfície da pele. O efeito da variação da concentração do soluto no espaço analisado ao longo do tempo é conhecido como difusão (CHARALAMBOPOULOU et al., 2001; CREMASCO, 2003). A importância de gerar a liberação controlada do princípio ativo consiste em dosar a quantidade necessária e mais eficiente do composto para que ajude na cicatrização, sem que ocorra intoxicação do indivíduo ou perda de produto, gerando custo desnecessários na fabricação do curativo.

As curvas de liberação da frutalina dos curativos são mostradas na figura 16 para CB-FTL 6 e para CBOXI-FTL 6.

Figura 16: Perfil de liberação da FTL nos curativos CB-FTL 6 e CBOXI-FTL 6.



Fonte: autoria própria.

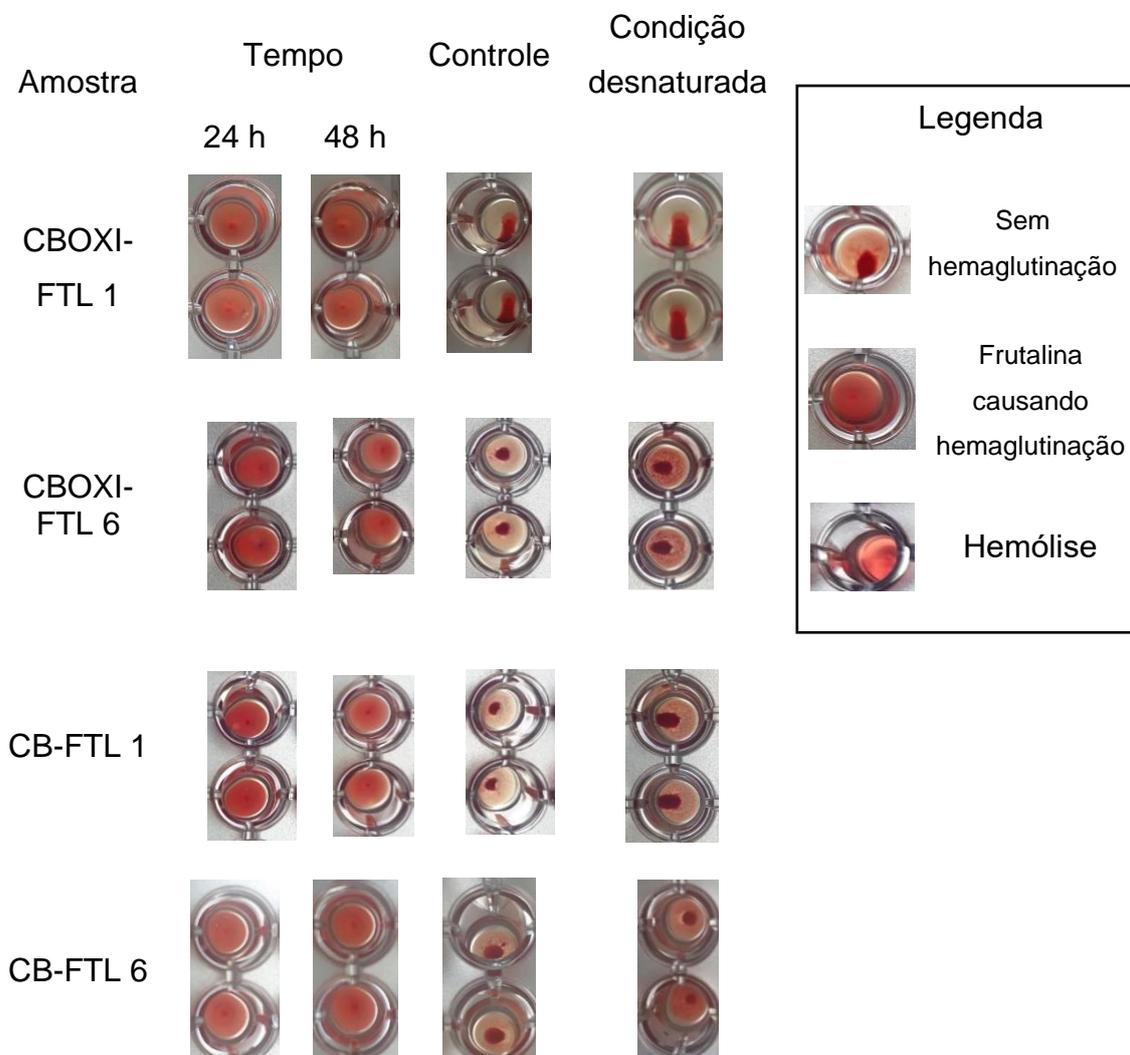
A liberação foi mais acentuada em CBOXI-FTL 6, com liberação de 97 % do bioativo em 24 h. Logo no início é possível observar uma maior taxa de liberação para CBOXI-FTL 6 nas primeiras 8 h por uma acumulação superficial da FTL na membrana. A amostra CBOXI-FTL 6 manteve a liberação maior do que CB-FTL 6 ao longo de 48 h. Esse perfil de maior liberação nas primeiras

horas foi visto por Vasconcelos e colaboradores com liberação da enzima papaína em CBOXI (VASCONCELOS; CUNHA; et al., 2020).

O modelo que melhor descreveu CBOXI-FTL 6 e CB-FTL 6 foi Korsmeyer-Peppas com os valores da constante apontando para liberação por difusão anômala não Fickiana (RITGER; PEPPAS, 1987) com coeficientes de correlação de Pearson (R^2), respectivamente, de 0,99 e 0,96. Assim esse modelo descreve a liberação da frutalina possui contribuição praticamente do efeito difusivo, sem observação de qualquer degradação da membrana.

Além de estudar o tempo e a forma de liberação da proteína, é necessário averiguar se as características do bioativo que sai do curativo são compatíveis com do bioativo purificado. As amostras CBOXI-FTL 1, CBOXI-FTL 6, CB-FTL 1 e CB-FTL 6 com seus respectivos controles sem proteína adsorvida foram colocadas em PBS por 24 h e 48 h, sendo testadas a liberação da FTL para o tampão pela atividade hemaglutinante da solução, figura 17. Em teste, com o extrato dessas quatro amostras relatadas com a liberação da molécula em PBS pH 7,4 em 24 h e 48 h a lectina que ficou em solução apresentou atividade hemaglutinante, mostrando que o processo de incorporação não modificou a atividade da lectina. Foi adicionado um controle com amostras submetidas a aquecimento 100 °C por 10 min. Foi observado hemaglutinação em todas as amostras com frutalina, inclusive na menor concentração. Isso indica um que em concentrações baixas a lectina pode ser detectada pelo método hemaglutinante (foi testado e obteve reação de hemaglutinação até 0,16 µg/mL de frutalina em eritrócitos de coelho 2 % em NaCl 0,15 mol/L). Não foi observado aglutinação nos controles e após desnaturação da amostra.

Figura 17: Análise de atividade hemaglutinante de alíquotas de PBS em contato com as amostras por 24 h e 48 h em duplicata.

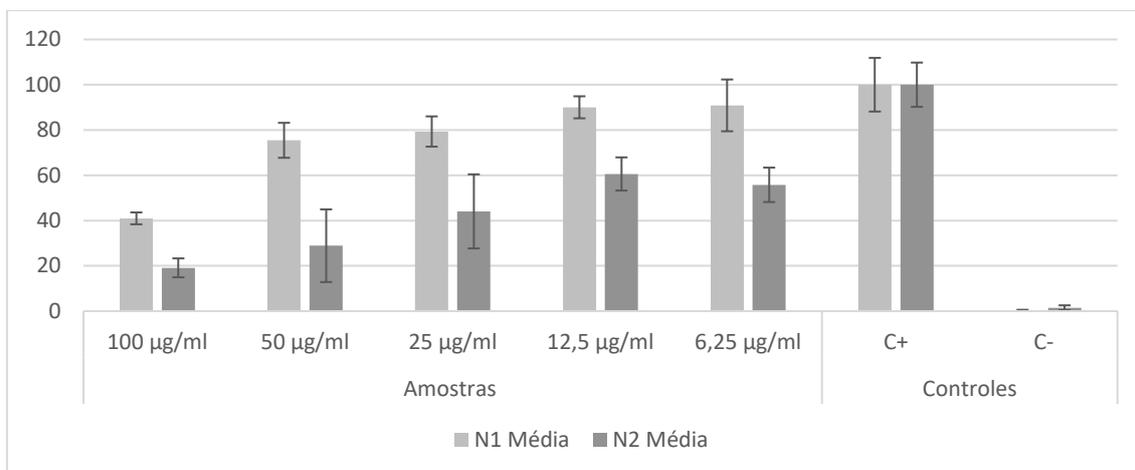


Fonte: autoria própria.

5.3 Testes *in vitro*

Sousa e colaboradores testaram alíquotas de FTL de 1 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 72 h em células da linhagem L929, sendo que nenhuma se apresentou citotóxica nessas condições. Com base nesse estudo, foi escolhida a concentração inicial 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, esterilizada em filtro de seringa 0,22 μm , com controles equivalentes ao volume de solução salina usada e realizada diluição seriada para teste prévio de citotoxicidade da frutalina purificada e resultados apresentados na figura 18.

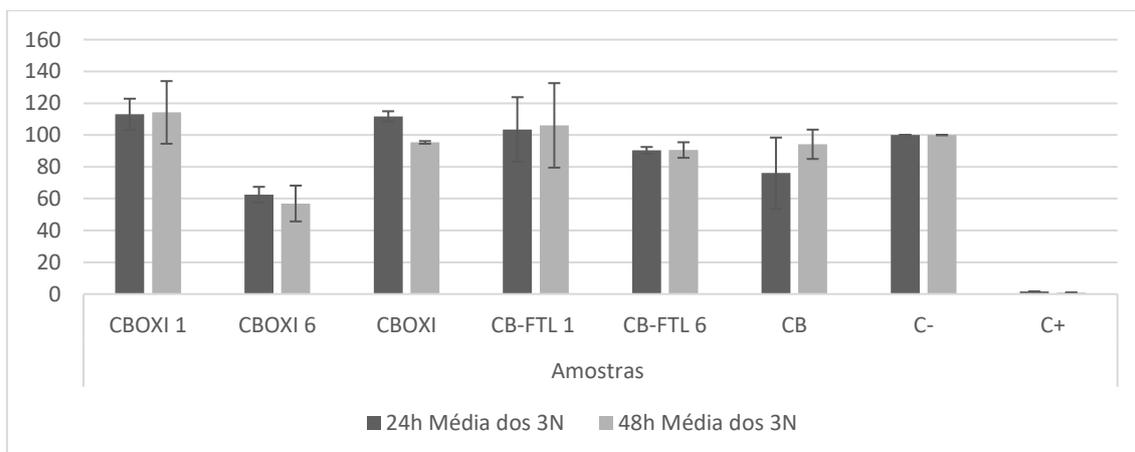
Figura 18: Citotoxicidade da frutalina purificada em fibroblastos (L929).



Fonte: autoria própria.

As alíquotas de FTL em solução se mostraram não citotóxicas a L929 entre de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 24 h. As amostras CB-FTL 1 e CBOXI-FTL 1 foram comparadas quanto ao efeito citotóxico em L929. Além disso, também foi investigado o efeito da segunda amostra de maior rendimento imobilização, CBOXI-FTL 6, e comparado com a CB-FTL 6. Os resultados da citotoxicidade estão na Figura 19 para queratinócitos linhagem HaCat.

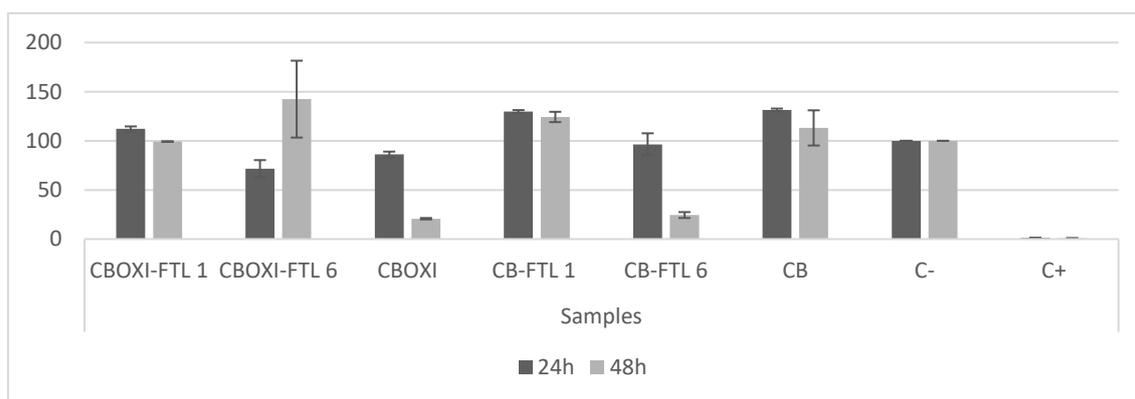
Figura 19: Citotoxicidade amostras em queratinócitos (HaCat).



Fonte: autoria própria.

A figura 20 mostra a citotoxicidade das amostras contra fibroblastos linhagem L929.

Figura 20: Citotoxicidade amostras em fibroblastos (L929).

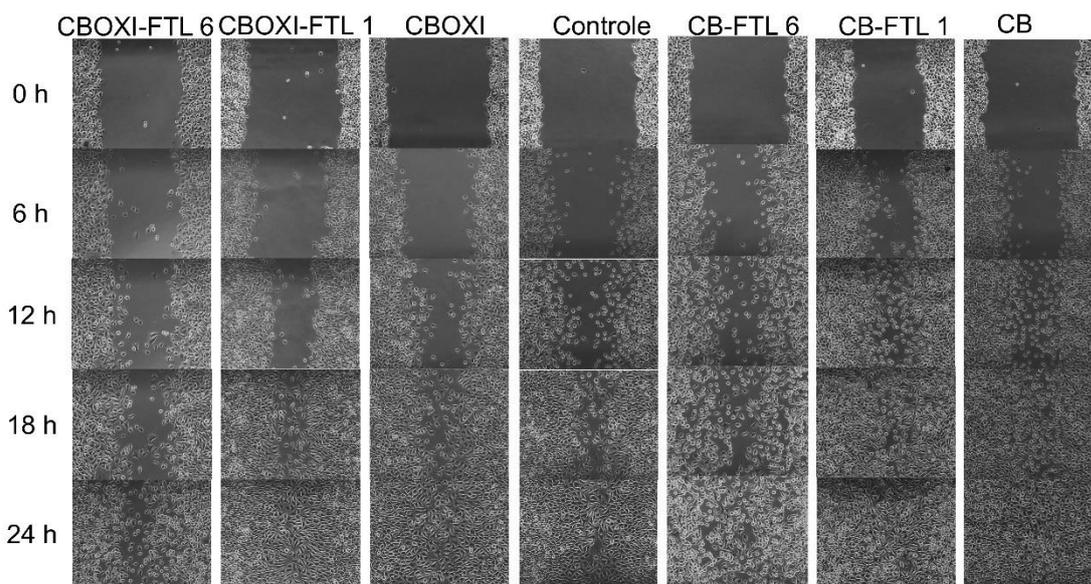


Fonte: autoria própria.

O efeito da proteína em suspensão na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi 20 % mais citotóxica do que na amostra CBOXI-FTL 6, o que pode mostrar que nem toda a proteína é liberada da membrana. CBOXI-FTL 1 mostrou melhor viabilidade celular quando comparado ao controle CBOXI. Com isso, temos indícios que uma dosagem a concentrações baixas de FTL na membrana é não citotóxica e mantém atividade característica da proteína de hemaglutinação. Devido a taxa de viabilidade celular encontrada para essa amostra foi investigado o efeito antimicrobiano da amostra, no tópico 5.4, e comparada a CB-FTL 6, amostra com a celulose bacteriana nas mesmas condições de produção da CBOXI-FTL 6. Sousa e colaboradores relataram efeito não citotóxico da frutalina na concentração abaixo de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em fibroblastos humanos (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS et al., 2019). Oliveira *et. al* testou dosagens de 18, 60, 100 e $144 \mu\text{g mL}^{-1}$ em células HeLa, se mostrando tóxicas a partir de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o tempo de 24 h de contato com as células (OLIVEIRA et al., 2011).

Outro estudo da ação em células foi o de migração de fibroblastos, figura 21. Esse é um teste que simula uma cicatrização, na forma *in vitro*, fazendo um “*scratch*” ou rasgo, avaliando somente a mobilidade das células como se fosse o fechamento da lesão nos eventos de cicatrização chamadas de proliferação e remodelação dos tecidos. Para isso é utilizado um composto chamado mitomicina C, que inibe propagação celular sem impedir a mobilidade das células. Simulando a ação do curativo servindo como um teste prévio à testes mais complexos, como os testes *in vivo*, ajudando a escolher as melhores amostras para as etapas posteriores de avaliação de produto de uso médico (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS et al., 2019; GELLER et al., 2015). Esse teste foi realizado através da captura de imagens em câmera acopladas em microscópio e calculado a taxa de redução de área com valores na tabela 5.

Figura 21: Imagens capturadas do ensaio de migração de fibroblastos sob efeito dos curativos para os tempos de 0, 6, 12, 18 e 24 h de contato da amostra.



Fonte: autoria própria.

Em comparação com a membrana controle sem a frutalina (CBOXI) o curativo bioativo (CBOXI-FTL 1) mostrou tendência a estimular a cicatrização *in vitro*. Ele foi produzido em 6h de incorporação, em uma concentração baixa de lectina de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foi observado também para o curativo CB-FTL 1 também uma tendência ao estímulo de migração dos fibroblastos, células que constitui a

derme, comparada ao seu controle sem a lectina. Esse estímulo é verificado com a maior taxa percentual de fechamento da lesão induzida *in vitro*.

Tabela 5: Taxa de redução do Scratch (%).

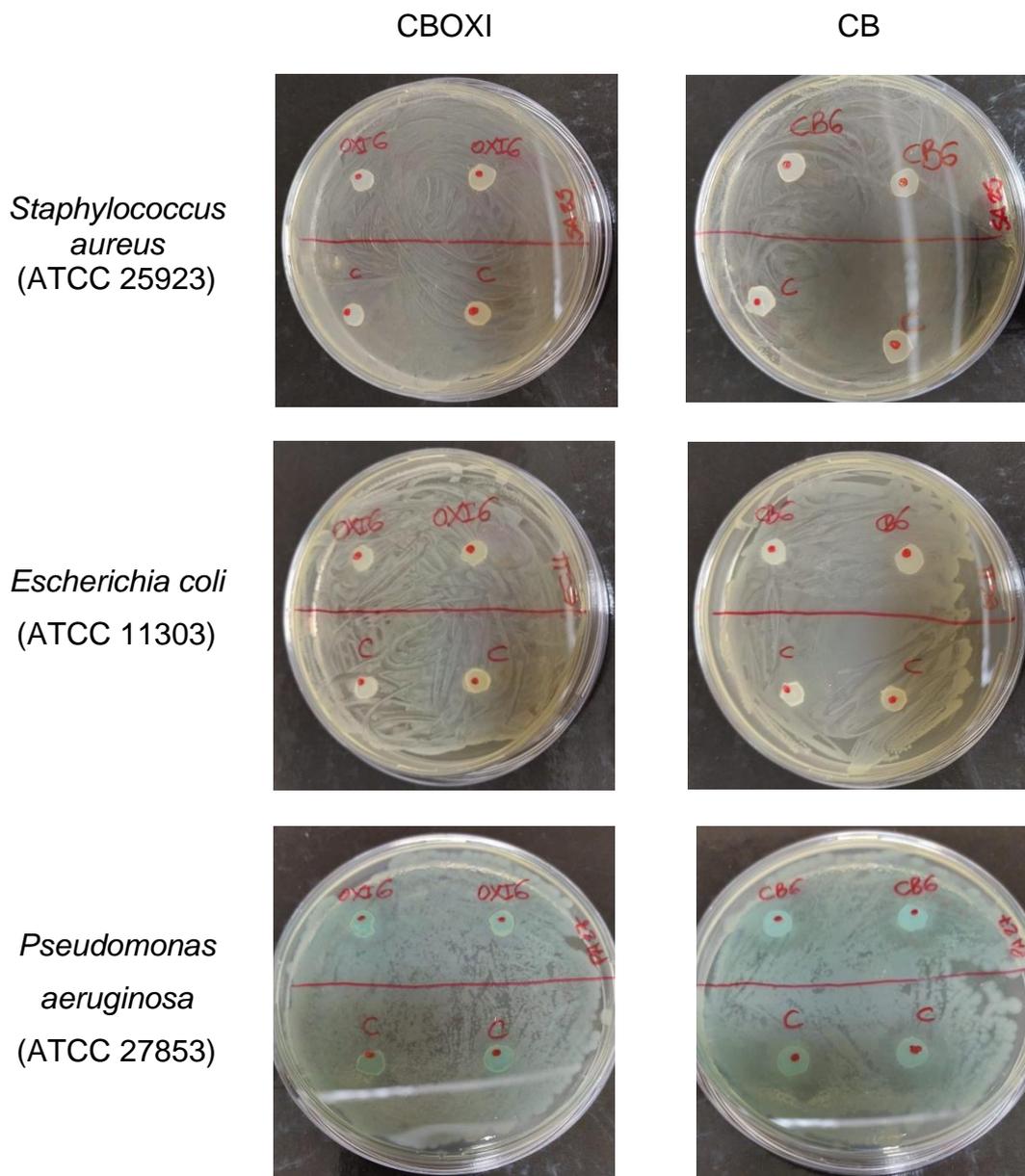
Amostra	Tempo (h)			
	6	12	18	24
CBOXI	23,7 ± 3,8	51,4 ± 1,0	65,4 ± 1,1	100 ± 0,8
CBOXI-FTL 6	35,0 ± 9,0	47,1 ± 6,4	59,0 ± 3,5	88,9 ± 0,3
CBOXI-FTL 1	34,4 ± 8,2	61,8 ± 1,3	77,2 ± 8,0	100 ± 10,2
CB	36,6 ± 4,0	63,9 ± 4,7	96,9 ± 0,4	100 ± 0,5
CB-FTL 6	25,9 ± 3,8	47,2 ± 2,5	64,3 ± 4,3	92,0 ± 0,3
CB-FTL 1	50,4 ± 0,6	81,9 ± 3,0	94,4 ± 3,0	100 ± 1,0

Pelas imagens capturadas pode ser observado o efeito de fechamento do rasgo primeiramente para as amostras CBOXI-FTL 1, CB-FTL 1 e seus controles, em concordância com o efeito de menor toxicidade para HaCat e L929 apresentado nos gráficos 19 e 20 do que as amostras CBOXI-FTL 6 e CB-FTL 6. A taxa de fechamento da amostra da CBOXI é inferior a CB sem a modificação química. A frutalina nativa pura pode ser heterogênea entre os lotes de purificação devido a presença de diferentes isoformas na alíquota (OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2013). Elas possuem pequenas diferenças na sequência de aminoácidos que podem conferir diferentes propriedade biológicas para a molécula (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esse pode ser um dos motivos pelos quais o resultado de citotoxicidade para a concentração de 100 µg/mL até 25 µg mL⁻¹ se mostrou diferente de Sousa *et. al* (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS *et al.*, 2019).

5.4 Ensaio de atividade antimicrobiana

Bactérias comuns no ambiente externo ao corpo que são principais agentes infecciosos de feridas na pele, dificultando a cicatrização (LI, YANG *et al.*, 2021). Foi realizado o teste de atividade antimicrobiana para estudar o efeito dos curativos em contato com *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As imagens do ensaio de disco-difusão em ágar Mueller Hinton estão representadas na figura 22.

Figura 22: Teste microbiano de disco difusão para CBOXI e CB com frutalina adsorvida na concentração de 100 µg/mL.



Fonte: autoria própria.

Foi realizado o teste com maior rendimento de imobilização de frutalina CBOXI-FTL 6 comparada a CB-FTL 6, tomando por base o resultado do ensaio de citotoxicidade e as concentrações de lectina usados em ensaios microbiológicos na literatura. Como a utilizada por Sousa e colaboradores com proteína isolada em várias diluições a partir de 1 mg mL⁻¹ não apresentou

atividade bacteriostáticas (MIC) ou bactericidas (MBC) em concentrações abaixo dessa concentração, sendo os resultados as Figura 22 consistentes com a literatura apesar do efeito citotóxico da amostra (DE SOUSA, FELIPE DOMINGOS *et al.*, 2019). O efeito antibacteriano pode ser atribuído a membrana com adição de antibióticos comerciais e pode ser estudado uma interação da frutalina com solução de prata, agente bacteriano comumente utilizado e de baixo custo.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que foi validado um modelo para produção de curativos de CB e CBOXI associado a frutalina nativa podem ser produzidos sem efeitos citotóxicos na condição do curativo OXI 1 nos intervalos de variáveis estudados mostrando tendência a estimular a cicatrização em relação ao controle sem frutalina.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estabilidade dos curativos ao longo do tempo e tempo de prateleira.
- Testes de interação da frutalina com antibióticos comerciais, solução de nitrato de prata ou outros agentes antimicrobianos.
- Produção de curativos com frutalina recombinante para comparação com o modelo estudado utilizando a forma nativa adsorvida na biocelulose, a ação em células fibroblastos e queratinócitos.
- Estudo da liberação frutalina recombinante de curativos de biocelulose.

8 REFERÊNCIAS

ABDON, Ana Paula De Vasconcellos et al. Gastroprotective potential of frutalin, a d-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. *Fitoterapia*, v. 83, n. 3, p. 604–608, 2012.

AMBEKAR, Rushikesh S.; KANDASUBRAMANIAN, Balasubramanian. Advancements in nanofibers for wound dressing: A review. *European Polymer Journal*, v. 117, n. March, p. 304–336, 2019.

ASANARONG, Oranatee et al. Bioactive wound dressing using bacterial cellulose loaded with papain composite: Morphology, loading/release and antibacterial properties. *European Polymer Journal*, v. 143, p. 110224, 15 jan. 2021. Acesso em: 26 out. 2021.

ATAIDE, Janaína Artem et al. Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 2–10, 2017.

BAYAZIDI, Pashew; ALMASI, Hadi; ASL, Asghar Khosrowshahi. Immobilization of lysozyme on bacterial cellulose nanofibers: Characteristics, antimicrobial activity and morphological properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 2544–2551, 1 fev. 2018. Acesso em: 26 nov. 2021.

BOMBALDI DE SOUZA, Renata Francielle et al. Biopolymer-based films and membranes as wound dressings. *Biopolymer Membranes and Films*. [S.l.: s.n.], 2020. p. 165–194.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRANDO-LIMA, Aline C. et al. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils:

Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 208, n. 2, p. 145–154, 2005.

BRANDO-LIMA, Aline C et al. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase – Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. v. 6, p. 465–472, 2006.

CADAU, S. et al. 680 New 3D reconstructed hypodermis model without substrate to evaluate adipose tissue remodeling. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 137, n. 10, p. S309, 1 out. 2017. Acesso em: 6 nov. 2021.

CAMPANA, Patricia T. et al. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. *European Journal of Biochemistry*, v. 269, n. 3, p. 753–758, 2002.

CECÍLIO, Nerry Tatiana et al. Yeast expressed ArtinM shares structure, carbohydrate recognition, and biological effects with native ArtinM. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 82, p. 22–30, 1 jan. 2016. Acesso em: 25 nov. 2021.

CHARALAMBOPOULOU, G. Ch et al. Numerical and experimental investigation of the diffusional release of a dispersed solute from polymeric multilaminate matrices. *Journal of Controlled Release*, v. 70, n. 3, p. 309–319, 23 fev. 2001. Acesso em: 26 nov. 2021.

CHUAH, Clarence et al. Novel bacterial cellulose-poly (acrylic acid) hybrid hydrogels with controllable antimicrobial ability as dressings for chronic wounds. *Polymers*, v. 10, n. 12, 2018.

COALSON, Elam et al. Stem cell therapy for chronic skin wounds in the era of personalized medicine: From bench to bedside. *Genes & Diseases*, v. 6, n. 4, p. 342–358, 1 dez. 2019. Acesso em: 30 out. 2021.

COIMBRA, Cynthia Gisele de Oliveira. Produção de celulose bacteriana por *Gluconacetobacter xylinus* e elaboração de filmes comestíveis. 2016. 1–139 f. Recife, 2016.

COLTRI, Kely C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *American Journal of Pathology*, v. 173, n. 2, p. 423–432, 2008.

COSERI, Sergiu et al. Oxidized cellulose—Survey of the most recent achievements. *Carbohydrate Polymers*, v. 93, n. 1, p. 207–215, 1 mar. 2013. Acesso em: 30 out. 2021.

CREMASCO, M. A. Fundamentos de Transferência de Massa. 2a ed ed. [S.l: s.n.], 2003.

DA SILVA, Luis Lamberti Pinto et al. PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING LECTIN KM+. . Brasil: [s.n.] , 2004

DAMASCENO, MARINA DE BARROS MAMEDE VIDAL et al. FORMULAÇÃO E PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOCÁPSULAS DE FRUTALINA PARA O CONTROLE E TRATAMENTO DA DOR OROFACIAL POR VIA ORAL. . [S.l: s.n.] , 2020

DAMME, Els J. M. Van et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

DE SOUSA, Felipe Domingos et al. Hydrogel and membrane scaffold formulations of Frutalin (breadfruit lectin) within a polysaccharide galactomannan matrix have potential for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 121, p. 429–442, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.050>>.

DE SOUSA MORAES, Paula Rodrigues Fontes et al. Bacterial cellulose/collagen hydrogel for wound healing. *Materials Research*, v. 19, n. 1, p. 106–116, 2016.

DONG, Ruonan; GUO, Baolin. Smart wound dressings for wound healing. *Nano Today*, v. 41, p. 101290, 1 dez. 2021. Acesso em: 25 nov. 2021.

DONG, Yang et al. A novel CHS/ALG bi-layer composite membrane with sustained antimicrobial efficacy used as wound dressing. *Chinese Chemical Letters*, v. 21, n. 8, p. 1011–1014, 1 ago. 2010. Acesso em: 3 fev. 2022.

DUARTE, Éden Batista et al. Celulose bacteriana: propriedades, meios fermentativos e aplicações. *Documentos (Embrapa Agroindústria Tropical)*, v. 186, p. 1–37, 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1109174/celulose-bacteriana-propriedades-meios-fermentativos-e-aplicacoes%0Ahttp://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197530/1/DOC19001.pdf>>.

DUTRA, J. A.P. et al. Papain wound dressings obtained from poly(vinyl alcohol)/calcium alginate blends as new pharmaceutical dosage form: Preparation and preliminary evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 113, p. 11–23, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.001>>.

EMING, Sabine A.; KRIEG, Thomas; DAVIDSON, Jeffrey M. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700701>>.

FAVI, Pelagie Marlene et al. Preparation and characterization of biodegradable nano hydroxyapatite–bacterial cellulose composites with well-defined honeycomb pore arrays for bone tissue engineering applications. *Cellulose*, v. 23, n. 2, p. 1263–1282, 2016.

FORSLIND, B. O. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Dermato-Venereologica*. [S.l: s.n.]. , 1994

FRANZ, Thomas J. PERCUTANEOUS ABSORPTION . ON THE RELEVANCE OF IN VITRO DATA. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12533356>>.

GARCIA, Lana Glerieide Silva et al. Essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 166, p. 621–632, jan. 2021.

GELLER, Fabiana Cristina et al. Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. *Phytotherapy Research*, v. 29, n. 12, p. 1887–1893, 2015.

GOMES FILHO, Márcio Sampaio. Um estudo da liberação controlada de fármacos através de modelos em rede. 2020. 114 f. f. Universidade de Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.slideshare.net/maryamkazemi3/stability-of-colloids%0Ahttps://barnard.edu/sites/default/files/inline/student_user_guide_for_spss.pdf%0Ahttp://www.ibm.com/support%0Ahttp://www.spss.com/sites/dm-book/legacy/ProgDataMgmt_SPSS17.pdf%0Ahttps://www.n>.

GORGIEVA, Selestina; TRCEK, Janja. Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials (Basel)*, v. 9 (10), 13, 2019.

GREIL, Peter; LIFKA, Thomas; KAINDL, Annette. Biomorphic Cellular Silicon Carbide Ceramics from Wood: I. Processing and Microstructure. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 18, n. 14, p. 1961–1973, 1 dez. 1998. Acesso em: 25 nov. 2021.

GRUPPUSO, Martina et al. Polymeric wound dressings, an insight into polysaccharide-based electrospun membranes. *Applied Materials Today*, v. 24, p. 101148, 1 set. 2021. Acesso em: 2 fev. 2022.

IDRUS, Ruszymah Bt Hj et al. Full-thickness skin wound healing using autologous keratinocytes and dermal fibroblasts with fibrin: Bilayered versus single-layered substitute. *Advances in Skin and Wound Care*, v. 27, n. 4, p. 171–180, 2014.

ISLAM, Mazhar Ul et al. Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 102, p. 1166–1173, 1 set. 2017. Acesso em: 6 nov. 2021.

KIM, Tae Hyun et al. Electricity auto-generating skin patch promotes wound healing process by activation of mechanosensitive ion channels. *Biomaterials*, v. 275, p. 120948, 1 ago. 2021. Acesso em: 6 nov. 2021.

LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana Maria; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume lectins: Proteins with diverse applications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017.

LAI-CHEONG, Joey E.; MCGRATH, John A. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (United Kingdom)*, v. 45, n. 6, p. 347–351, 2017.

LAM, Sze Kwan; NG, Tzi Bun. Lectins: Production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011.

LEITE, Talita Abrante. CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA FRUTALINA RECOMBINANTE E SUA APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS A1 (SIgA1) SECRETORAS HUMANAS. . Fortaleza: [s.n.], 2016.

LI, Jue et al. Production of high crystallinity type-I cellulose from *Komagataeibacter hansenii* JR-02 isolated from Kombucha tea. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 66, n. 1, p. 108–118, 2019.

LI, Meng et al. Injectable stretchable self-healing dual dynamic network hydrogel as adhesive anti-oxidant wound dressing for photothermal clearance of bacteria and promoting wound healing of MRSA infected motion wounds. *Chemical Engineering Journal*, v. 427, p. 132039, 1 jan. 2022. Acesso em: 22 out. 2021.

LI, Yang et al. Mussel-inspired adhesive bilayer hydrogels for bacteria-infected wound healing via NIR-enhanced nanozyme therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, p. 112230, 23 nov. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776521006767>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

LI, Ying et al. Correction: Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair (*Journal of Materials Chemistry B* (2015) 3 (3498–3507) DOI: 10.1039/C4TB01819B). *Journal of Materials Chemistry B*, v. 7, n. 11, p. 1962, 2019.

LIAKOS, Ioannis et al. All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 463, n. 2, p. 137–145, 25 mar. 2014. Acesso em: 3 fev. 2022.

LIN, Dehui et al. Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 158, p. 1007–1019, 1 set. 2020. Acesso em: 6 nov. 2021.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, p. 143–154, 2005.

LUZ, Erika Patrícia Chagas Gomes et al. In vitro degradability and bioactivity of oxidized bacterial cellulose- hydroxyapatite composites. *Carbohydrate Polymers*, v. 237, n. January, p. 116174, 2020.

LUZ, Erika Patricia Chagas Gomes et al. Resorbable bacterial cellulose membranes with strontium release for guided bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*, v. 116, n. June, p. 111175, 2020.

MENDONÇA, Sofia Emanuela Soares. Elucidation of the molecular mechanisms underlying the cytotoxic effect of recombinant frutalin in human tumor cells. 2013. 82 f. University of Minho, 2013.

MIGUEL, Sónia P. et al. An overview of electrospun membranes loaded with bioactive molecules for improving the wound healing process. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 139, n. February, p. 1–22, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.03.010>>.

MIGUEL, Sónia P.; MOREIRA, André F.; CORREIA, Ilídio J. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 127, p. 460–475, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.072>>.

MIRCIOIU, Constantin et al. Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 3, 2019.

MOREIRA, ANA CRISTINA DE OLIVEIRA MONTEIRO et al. UTILIZAÇÃO DA LECTINA A-D-GALACTOSE-LIGANTE DE SEMENTES DE *ARTOCARPUS INCISA* L., FRUTALINA, BIOTINILADA, NO DIAGNÓSTICO DE PATOLOGIAS PROSTÁTICAS. . [S.l: s.n.] , 2013

MOREIRA FILHO, Raimundo Nonato Fernandes et al. Papain immobilized on alginate membrane for wound dressing application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 194, n. June, p. 111222, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111222>>.

MOREIRA, Renato A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*, v. 47, n. 7, p. 1183–1188, 1998.

MOURA, Liane I. F. et al. Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review. *Acta Biomaterialia*, v. 9, n. 7, p. 7093–7114, 1 jul. 2013. Acesso em: 3 fev. 2022.

MURRAY, PATRICK R; ROSENTHAL, KEN S; PFALLER, Michael A. *Microbiologia Médica*. 7a edição ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2014.

NICK, C; GRAY, Theronica. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. p. 2411–2423, 1995.

NOBRE, Thatyane M. et al. The specificity of frutalin lectin using biomembrane models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1798, n. 8, p. 1547–1555, 1 ago. 2010. Acesso em: 23 nov. 2021.

NYPELÖ, Tiina et al. Review: Periodate oxidation of wood polysaccharides—Modulation of hierarchies. *Carbohydrate Polymers*, v. 252, n. September 2020, 2021.

OLIVEIRA, Carla et al. CDNA Cloning and Functional Expression of the α -d-Galactose-Binding Lectin Frutalin in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, v. 43, n. 3, p. 212–220, 2009.

OLIVEIRA, Carla et al. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on Hela cervical cancer cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, 2011.

OLIVEIRA, Carla et al. Cytotoxicity of frutalin on distinct cancer cells is independent of its glycosylation. *Molecules*, v. 26, n. 16, p. 1–13, 2021.

OLIVEIRA, Carla; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, Lucília. Recombinant lectins: An array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 33, n. 1, p. 66–80, 2013.

PATIL, Priyanka P.; REAGAN, Michaela R.; BOHARA, Raghvendra A. Silk fibroin and silk-based biomaterial derivatives for ideal wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 164, p. 4613–4627, 1 dez. 2020. Acesso em: 26 dez. 2021.

PAUL, Willi; SHARMA, Chandra P. *Advances in Wound Healing Materials: Science and Skin Engineering*. A Smithers Group Company Shawbury. [S.l.: s.n.], 2015. v. 1. p. 81–102.

POGORELOVA, Natalia et al. Bacterial cellulose nanocomposites. *Bio-based Polymers and Nanocomposites: Preparation, Processing, Properties & Performance*, p. 87–105, 2019.

PONCE, Julia et al. Alkali pretreated sugarcane bagasse, rice husk and corn husk wastes as lignocellulosic biosorbents for dyes. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v. 2, p. 100061, 25 dez. 2021. Acesso em: 25 nov. 2021.

RITGER, Philip L.; PEPPAS, Nikolaos A. A SIMPLE EQUATION FOR DESCRIPTION OF SOLUTE RELEASE I. FICKIAN AND NON-FICKIAN RELEASE FROM NON-SWELIABLE DEVICES IN THE FORM OF SLABS, SPHERES, CYLINDERS OR DISCS. *Journal of Controlled Release*, v. 5, p. 23–36, 1987.

RIVITTI, Evandro A. *Manual de Dermatologia Clínica*. São Paulo: [s.n.], 2014.

SCHNEIDER, Caroline A; RASBAND, Wayne S; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, v. 9, p. 671–675, 2012.

SHARON, N; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, v. 246, n. 4927, p. 227–234, 1989. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/abstract/246/4927/227>>.

SIKKA, Monica Puri; MIDHA, Vinay Kumar. The role of biopolymers and biodegradable polymeric dressings in managing chronic wounds. Second Edi ed. [S.I.]: Elsevier Ltd, 2019.

SOARES-COSTA, M. A.A. et al. Effects of frutalin and doxorubicin on growth, ultrastructure and gene expression in goat secondary follicles cultured in vitro. *Research in Veterinary Science*, v. 120, p. 33–40, 1 out. 2018. Acesso em: 26 nov. 2021.

SOUSA, Felipe Domingos de. Clonagem e expressão da lectina frutapina em *Escherichia coli*: Análises estruturais. 2018. 96 f f. 2018.

STRAMER, Brian M.; MORI, Ryoichi; MARTIN, Paul. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, n. 5, p. 1009–1017, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5700811>>.

THADEPALLI, Srivani. Review of multifarious applications of polymers in medical and health care textiles. *Materials Today: Proceedings*, 20 set. 2021. Acesso em: 22 out. 2021.

THU, Hnin Ei; ZULFAKAR, Mohd Hanif; NG, Shiew Fern. Alginate based bilayer hydrocolloid films as potential slow-release modern wound dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 434, n. 1–2, p. 375–383, 15 set. 2012. Acesso em: 3 fev. 2022.

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi; ANDRADE, Fábica Karine; et al. Oxidized bacterial cellulose membrane as support for enzyme immobilization: properties and morphological features. *Cellulose*, v. 27, n. 6, p. 3055–3083, 2020.

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi; CUNHA, Arcelina Pacheco; et al. Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds. *International Journal of Biological*

Macromolecules, v. 165, p. 3065–3077, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.200>>.

VIEIRA NETO, Antonio Eufrásio. Caracterização estrutural da frutalina, uma lectina α -D-galactose ligante de sementes de *Artocarpus Incisa* e análise das suas bases moleculares de ligação a D-galactose. Fortaleza-CE: [s.n.], 2015.

VIEIRA NETO, Antônio Eufrásio et al. New structural insights into anomeric carbohydrate recognition by frutalin: an α -d-galactose-binding lectin from breadfruit seeds. *Biochemical Journal*, v. v. 476, n. 1, p. 101–113, 2019.

WELLER, C.; WELLER, C.; TEAM, V. Interactive dressings and their role in moist wound management. *Advanced Textiles for Wound Care*. Second Edi ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2019. p. 105–134.

WU, Chun Nan et al. TEMPO-Oxidized Bacterial Cellulose Pellicle with Silver Nanoparticles for Wound Dressing. *Biomacromolecules*, v. 19, n. 2, p. 544–554, 2018.

ZHONG, Jiamin et al. Reversibly immortalized keratinocytes (iKera) facilitate re-epithelization and skin wound healing: Potential applications in cell-based skin tissue engineering. *Bioactive Materials*, 29 jul. 2021. Acesso em: 30 out. 2021.

ZYWICKA, Anna et al. Modification of Bacterial Cellulose with Quaternary Ammonium Compounds Based on Fatty Acids and Amino Acids and the Effect on Antimicrobial Activity. *Biomacromolecules*, v. 19, n. 5, p. 1528–1538, 2018.