

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC – UFABC

Projeto de Pesquisa para Iniciação Científica - Edital Nº 04/2022

Membrana bioativa de gelatina e *Himatanthus drasticus* para regeneração de pele

São Bernardo do Campo / SP

Junho / 2022

RESUMO

O avanço na área da saúde contribui cada vez mais para uma maior expectativa de vida frente aos inúmeros tratamentos conhecidos e aperfeiçoados que são respaldados pela constante evolução na tecnologia. A engenharia biomédica, por sua vez, é responsável por criar ou aperfeiçoar a tecnologia que será aplicada na área da saúde e, entre seus campos de atuação, encontra-se a engenharia de tecidos, a qual atua principalmente no estudo de substitutos biológicos. A pele, que é o maior órgão do corpo humano e está em constante contato com o meio externo, apresenta inúmeros desafios que podem e devem ser assistidos pela engenharia de tecidos como no uso de membranas bioativas. Os fitoterápicos, por outro lado, apresentam diversas substâncias químicas com potências medicinais eficientes e comprovados, como o caso da espécie *Himatathus drasticus*. Tendo em vista esse cenário, o objetivo dessa pesquisa é o preparo e a caracterização de membrana bioativa de gelatina e *Himatanthus drasticus*, visando o desenvolvimento de curativos para regeneração da pele

Palavras-chave do projeto: Curativo; Engenharia de Tecidos; Gelatina; *Himatanthus* sp; Técnicas *in vitro* .

Área de conhecimento do projeto: Engenharia Biomédica, Engenharia de Tecidos.

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS e METAS.....	3
3. METODOLOGIA.....	3
3.1. Extratos	3
3.2. Membranas	3
3.3 Avaliação morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)	4
3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	4
3.5 Ângulo de contato	4
3.6. Cultura de células: citotoxicidade	4
4. CRONOGRAMA	6
5. BIBLIOGRAFIA.....	7

1. INTRODUÇÃO

A medicina é a área responsável pela manutenção da saúde humana através do diagnóstico, prevenção ou tratamento de enfermidades, as quais podem afetar não só o bem-estar físico do paciente, mas também o mental, social e psicológico.

O avanço na área da saúde contribui cada vez mais para uma maior expectativa de vida frente aos inúmeros tratamentos conhecidos e aperfeiçoados que são respaldados pela constante evolução na tecnologia, a qual tornou-se crucial para a medicina moderna (LEGO, 2015). A engenharia biomédica, por sua vez, é o campo de intersecção entre as ciências biológicas e exatas encarregado de criar ou aperfeiçoar a tecnologia que será aplicada na área da saúde e, assim, contribuir para a sociedade.

Um dos campos de atuação da engenharia biomédica é o estudo e análise de substitutos biológicos, os quais podem restaurar a função de um tecido ou apenas melhorar e manter, assim é definido o conceito, já na era moderna, da engenharia de tecidos (RODRIGUES, 2012).

Entre as inúmeras doenças que podem acometer o corpo humano, as que interferem especificamente na pele destacam-se pelo fato de tratar do maior órgão do corpo humano e que está em constante contato com o meio externo. O câncer de pele, por exemplo, trata-se significativamente de 33% de todos os diagnósticos desta doença no Brasil (SBD, 2021). Além disso, as feridas crônicas estão diretamente relacionadas ao crescimento da expectativa de vida anteriormente citado, uma vez que essas tendem a se agravar no decorrer do envelhecimento do paciente (Parliament et al. 2009).

Tendo em vista esse cenário, é necessário que a engenharia de tecidos intervenha com pesquisas e soluções que tratam da pele como, por exemplo, em sua regeneração que depende de processos complexos e simultâneos e pode ser afetada pela perturbação no desenvolvimento ou mesmo pela extensão da lesão (SANTOS, 2017). As membranas bioativas são uma forma de tratamento de lesões cutâneas e são progressivamente consideradas como uma opção terapêutica (CAMPELO, HOLANDA, CAMPELO; 2021) .

Os fitoterápicos, por outro lado, são utilizados de forma massiva pela população brasileira para tratar de diferentes tipos de doenças e podem agregar à inúmeros tratamentos devido às substâncias presentes com potenciais medicinais.

A partir desse cenário, resultados promissores das propriedades fitoterápica do látex extraído de *Himathantus drasticus* e os resultados anteriores indicativos da não citotoxicidade e atividade antimicrobiana, essa etapa do estudo abordará o preparo e a caracterização de membranas bioativas de gelatina e látex da janaúba com o objetivo de contribuir para a regeneração da pele e, conseqüentemente, para a medicina.

2. OBJETIVOS e METAS

O objetivo do presente projeto é o preparo e a caracterização de membrana bioativa de gelatina e *Himatanthus drasticus*, visando o desenvolvimento de curativos para regeneração da pele.

Os objetivos específicos deste projeto são:

- Obtenção da membrana de gelatina de *Himatanthus drasticus*;
- Caracterização morfológica da membrana;
- Análise da composição da membrana
- Avaliação de citotoxicidade da membrana.

3. METODOLOGIA

3.1. Extratos

As amostras de janaúba serão coletadas em Pirituba, São Paulo, a temperatura ambiente. Serão preparados extratos brutos de *Himatanthus drasticus* a partir do látex desta planta segundo metodologia previamente descrita. Considera-se o uso popular do látex no preparo do extrato de teste, sendo utilizadas 32 gotas por litro de água (SOUSA, 2018). O extrato será armazenado em geladeira até o momento do uso.

3.2. Membranas

Para o desenvolvimento das membranas será utilizada metodologia descrita na literatura científica, adaptada às condições específicas desse projeto (BARROS, 2020; CHAGAS, 2021). Resumidamente, as membranas serão preparadas com 125 mg de gelatina dissolvida em 1,25 mL de água destilada, sendo acrescentados 1,9 mL de látex da janaúba. A solução será vertida em placas de Petri para polimerização e secagem, formando

membranas de 1 mm de espessura. As membranas serão esterilizadas por óxido de etileno para os ensaios posteriores.

3.3 Avaliação morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As membranas de gelatina e látex da janaúba serão submetidas à técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), para análise morfológica das mesmas. As membranas serão recobertas com 20 nm ouro e observadas ao microscópio eletrônico de varredura (FEI QUANTA).

3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As amostras esterilizadas e não esterilizadas das membranas serão submetidas à espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com o objetivo de verificar ligações químicas presentes nas membranas e a possibilidade de interferência do processo de esterilização nas mesmas.

3.5 Ângulo de contato

Será avaliado o ângulo de contato do biomaterial, pela medição da gota estática, utilizando o método sésil, com a detecção do perfil da gota em contato com a superfície do substrato, utilizando água destilada como fluido de deposição, com tensiômetro (Attension KSV).

3.6. Cultura de células: citotoxicidade

A cultura de células Vero (CCIAL 057) será realizada em meio HAM F10, contendo 10% de soro fetal bovino, sendo a cultura mantida a 37°C com 5% CO₂ (AMMERMAN et al., 2008). Serão realizadas trocas de meio de cultura a cada três dias, e

repiques quando houver confluência da monocamada celular. O acompanhamento das culturas será realizado por microscopia de fase, ao microscópio invertido (Axiovert A1 / Zeiss). Esta linhagem celular é considerada padrão para testes de resposta celular para citotoxicidade (ISO 10993-5, 2009).

Será realizado teste citotoxicidade direta, por meio de protocolo adaptado da norma ISO 10993-5 (2009), com os extratos brutos. As concentrações de teste serão de 25, 50, 75 e 100 µg/mL (MOURA, 2016; MOURA et al., 2020).

Para a citotoxicidade as células Vero serão inoculadas em placas de 96 poços, em concentração de 10^4 células/poço. As culturas celulares serão incubadas por 24 horas, e após este serão expostas a ação do extrato nas concentrações descritas. Como controle serão utilizados o cultivo padrão das células (controle negativo) e dimetilsulfóxido (DMSO, controle positivo).

A avaliação qualitativa envolve a observação morfológica das células após 24 horas de contato com o extrato, por microscopia de luz, com contraste de fase. A avaliação quantitativa será realizada por ensaio de MTT (brometo de 3-[4, 5-dimethyl thiazolone-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium), descrito na literatura (MOSMANN, 1983). Os resultados serão obtidos com leitura espectrofotométrica a 570 nm em leitor de Elisa. Serão apresentados dados de porcentagem da viabilidade celular relativa ao controle negativo. Será realizada análise estatística dos dados, com teste ANOVA one-way seguido de teste de Tuckey para $p < 5\%$.

4. CRONOGRAMA

As atividades propostas para o desenvolvimento do projeto serão realizadas no período de setembro de 2022 a agosto de 2023, conforme apresentado na tabela a seguir. Estão previstos o relatório parcial, em março de 2023, e o relatório final, em setembro de 2023, bem como a participação futura no Congresso de Iniciação Científica da UFABC de 2023. Segue a descrição do cronograma de atividades do projeto

Tabela 1. Planejamento de atividades para a execução do projeto

Descrição das atividades	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre
Revisão de literatura	X	X	X	X
Obtenção dos extratos	X	X	X	
Obtenção das membranas	X	X	X	
Caracterização morfológica		X	X	
Relatório Parcial			X	
FTIR			X	X
Ângulo de contato			X	X
Citotoxicidade			X	X
Relatório Final				X

5. BIBLIOGRAFIA

- AMMERMAN, NC; BEIER-SEXTON M; AZAD AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. Curr Protoc Microb, 11:4E:A.4E.1–A.4E.7. 2008.
- BARROS, NR. Desenvolvimento de blendas poliméricas de látex-alginato e látex-colágeno para aplicação em engenharia de tecidos. 2020. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Araraquara, 2020.
- CAMPELO, A. P. B. S. HOLANDA, E. U. CAMPELO, M. W. S. Medicina: Longe dos holofotes, perto das pessoas. Ed. 3. Ponta Grossa: Editora Atena. 2021.
- CHAGAS, ALD. Membranas de Látex Natural com colágeno para o tratamento de úlceras por pé diabético. 2021. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista – Unesp, Araraquara, 2021.
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. p.34, 2009.
- LEGO, V. Limites da expectativa de vida humana e as biotecnologias. III Colóquio Internacional NEPC/IEAT. 2015.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application o proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Meth, v.65, p. 55-65. 1983.
- MOURA DF. Avaliação da toxicidade e efeitos biológicos do látex extraído de *Himatanthus drasticus* (Mart.) PLUMEL, Dissertação de Mestrado. PósGraduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- MOURA, DF; ROCHA, TA; BARROS, DM; SILVA, MM; LIRA, MAC; SOUZA, TGS; SILVA, CJA; AGUIAR JR, FCA; SANTOS, NPS; SOUZA, IA; ARAUJO, RM; XIMENES, RM; MARTINS, RD; SILVA, MV. Evaluation of the cytotoxicity, oral

- toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of the latex extracted from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). J Ethnopharmacol, v.253, p:112567, 2020.
- PARLIAMENT, The European et al. 2009. “Eucomed Wound Care Policy Paper”. 18(June): 9–10.
- RODRIGUES, B. F. F. S. Engenharia de tecidos para regeneração da pele: retrospectiva e perspectivas futuras. Dissertação de mestrado. Pós graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. 2012.
- SANTOS, M. P. C. PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS ELECTROFIADAS ASSIMÉTRICAS PARA REGENERAÇÃO DE PELE. Projeto de Tese na área científica de Engenharia Química. Universidade de Coimbra. 2017.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD). Câncer da pele. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/doencas/cancer-da-pele/> . Acesso em 21 de junho de 2022.