



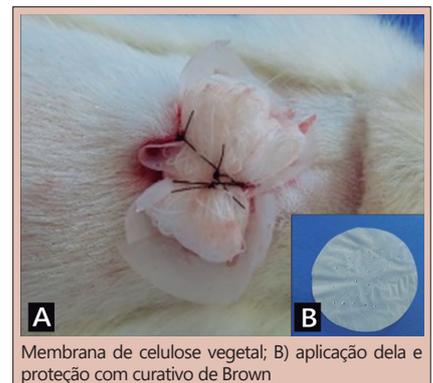
# CURATIVO DE NANOFIBRAS DE CELULOSE VEGETAL AUXILIA NA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS DE TERCEIRO GRAU? ESTUDO EM RATOS

*Vegetable cellulose nanofiber dressing aids in the healing process of third-grade burns? Study on rats*

Milka Lie TAKEJIMA<sup>1,2</sup>, Maria Angelica Baron MAGALHÃES<sup>1</sup>, Jurandir Marcondes RIBAS FILHO<sup>1</sup>, Fernando Issamu TABUSHI<sup>1</sup>, Carlos Cesar Bof BUFON<sup>1</sup>, Thayline Mylena Santana CAMARGO<sup>1</sup>, Isabela Calixto MALUF<sup>1</sup>, Osvaldo MALAFAIA<sup>1</sup>

**RESUMO - Racional:** O tratamento das queimaduras de 3º grau representa grande desafio na área médica. A celulose vegetal de pinus é biomaterial com características semelhantes às da celulose bacteriana. **Objetivo:** Avaliar a segurança da membrana de celulose vegetal (*Pinus sp*) no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos e comparar sua eficácia com a da membrana bacteriana já comercializada. **Método:** Trinta e três ratos Wistar foram submetidos à queimadura de 3º grau na pele do dorso mediante aplicação de água a 98° C durante 30 s. Em seguida, foram distribuídos em três grupos (n=11): grupo 1 - curativo simples com gaze; grupo 2 - curativo com membrana de celulose bacteriana; e grupo 3 - curativo com membrana de celulose vegetal. Os animais foram avaliados durante 15 dias para verificar o estado clínico geral, aspecto macroscópico, contração das feridas e análise microscópica pelo grau de cicatrização e colagenização. **Resultados:** Permaneceram clinicamente bem durante o experimento. Durante a retirada do curativo houve sangramento na ferida do grupo controle, diferentemente dos grupos tratados com as membranas de celulose, que protegeram o leito da lesão. A análise microscópica mostrou que a maioria das feridas apresentava-se em grau avançado de cicatrização, com predomínio de colágeno maduro em todos os grupos. Houve maior contração das feridas tratadas com as membranas em relação ao grupo controle. **Conclusão:** A membrana de celulose de *Pinus sp* apresentou eficácia semelhante à da membrana bacteriana no tratamento de queimaduras de 3º grau.

**DESCRITORES** - Queimaduras. Cicatrização. Celulose. Nanotecnologia. Nanoestruturas. Ferimentos e lesões.



Membrana de celulose vegetal; B) aplicação dela e proteção com curativo de Brown

## Mensagem central

As membranas de celulose vegetal produzidas a partir da árvore pinus apresentam segurança clínica e benefícios no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos.

## Perspectiva

O estudo demonstra a segurança clínica das membranas de celulose de origem vegetal no tratamento de queimaduras de terceiro grau em ratos. Esta membrana poderá se tornar uma grande aliada no tratamento de pacientes com feridas, úlceras e queimaduras, auxiliando na diminuição da dor e na frequência de trocas de curativos. A grande disponibilidade de matéria-prima vegetal acarretará na produção de uma membrana com menor custo, diminuindo os gastos da saúde no tratamento de queimaduras.

**ABSTRACT - Background:** The treatment of 3<sup>rd</sup> degree burns represents a major medical challenge. Pinus vegetable cellulose is a biomaterial with characteristic similar to bacterial cellulose. **Aim:** To evaluate the safety of cellulose membrane (*Pinus sp*) in the treatment of 3<sup>rd</sup> burns in rats and to compare its effectiveness with the bacterial membrane already on the market. **Method:** Thirty-three Wistar rats were beaten with a 3<sup>rd</sup> degree burn on back skin by applying water at 98° C for 30 s. Then, they were divided into three groups (n=11): group 1 - simple dressing with gauze; group 2 - dressing with bacterial cellulose membrane; and group 3 - dressing with vegetable cellulose membrane. The animals were maintained for 15 days to check the general clinical status, macroscopic aspect, contraction of the wounds and microscopic analysis for the degree of healing and collagenization. **Results:** They were clinically well during the experiment. During the removal of the dressing, there was bleeding in the wound of the control group, unlike the groups treated with cellulose membranes, which protected the bed from injury. The macroscopic evaluation showed a greater contraction of the wounds treated with the membranes in relation to the control. A microscopic analysis revealed that most of the wounds were in advanced healing degree with predominance of mature collagen in all groups. **Conclusion:** *Pinus sp* cellulose membrane showed efficacy similar to that of the bacterial membrane in the treatment of 3<sup>rd</sup> degree burns.

**HEADINGS** - Burns. Wound Healing. Cellulose. Nanotechnology. Nanostructures. Wounds and Injuries.



[www.facebook.com/abcdrevista](http://www.facebook.com/abcdrevista)



[www.instagram.com/abcdrevista](http://www.instagram.com/abcdrevista)



[www.twitter.com/abcdrevista](http://www.twitter.com/abcdrevista)

Trabalho realizado no <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Princípios da Cirurgia, Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; <sup>2</sup>Hospital Universitário Evangélico Mackenzie, Curitiba, PR, Brasil.

Como citar esse artigo: Takejima ML, Magalhães MAB, Ribas Filho JM, Tabushi FI, Bufon CC, Camargo TMS, Maluf IC, Malafaia O. Curativo de nanofibras de celulose vegetal auxilia na cicatrização de queimaduras de terceiro grau? Estudo em ratos. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2021;34(2):e1586. DOI: /10.1590/0102-672020210001e1586

## Correspondência:

Milka Lie Takejima  
E-mail: [mtakejima@yahoo.com.br](mailto:mtakejima@yahoo.com.br)

Fonte de financiamento: Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Conflito de interesse: não há

Recebido para publicação: 02/12/2020

Aceito para publicação: 01/03/2021



## INTRODUÇÃO

As queimaduras são consideradas um grande problema de saúde pública que atinge todos os grupos etários e classes sociais<sup>4</sup>. Segundo a Organização Mundial da Saúde<sup>30</sup>, elas são responsáveis por aproximadamente 180.000 mortes ao ano em todo mundo. No Brasil, representam a quarta causa de morte e hospitalização por acidente de crianças e adolescentes de até 14 anos de idade<sup>14</sup>.

Diferentes produtos têm sido utilizados para melhorar o processo de reparação tecidual<sup>4</sup>. Existem mais de 2.000 tipos de coberturas disponíveis no mercado internacional para o tratamento de feridas e queimaduras<sup>29</sup>. Estes podem ser classificados como sintéticos (derivados de produtos manufaturados ou desenvolvidos em laboratório) ou biológicos (derivados de tecidos naturais)<sup>23</sup>.

Desde 1980, a membrana de celulose obtida por *Gluconacetobacter xylinus* tem sido utilizada como substituto temporário da pele humana em queimaduras superficiais e profundas, áreas doadoras de enxertos, dermoabrasões mecânicas ou a laser, e úlceras venosas e arteriais<sup>20</sup>. Algumas vantagens da membrana de celulose incluem o fato de não serem tóxicas ou carcinogênicas e de sua biocompatibilidade, além de reter a umidade e favorecer a granulação no local da ferida<sup>21</sup>. Entretanto, a manufatura delas é processo de baixo rendimento e alto custo, por se tratar de síntese bacteriana.

Diante disso, o desenvolvimento de uma membrana de celulose a partir de vegetal, como a madeira de pinus, permitiria o reaproveitamento de subprodutos da agroindústria e podendo reduzir os custos de produção, favorecendo a sustentabilidade.

Assim, os objetivos desta pesquisa foram verificar a segurança clínica e a eficácia da membrana de celulose vegetal sobre a cicatrização de queimaduras de 3º grau em pele de ratos e compará-las com a segurança e eficácia da membrana de celulose bacteriana comercial (Membracel®).

## MÉTODO

O estudo foi realizado nas dependências do Laboratório de Cirurgia Experimental do Instituto de Pesquisas Médicas da Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná (FEMPAR). Ele foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da FEMPAR sob o número 872/2019, regido pela Lei 11.794.

### Produção das nanofibras de celulose

As nanofibras provenientes da madeira pinus (*Pinus sp*) foram produzidas no Laboratório de Tecnologia da Madeira da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Florestas), localizada em Colombo, PR, Brasil.

O processo de extração da hemicelulose foi realizado através do branqueamento da polpa celulósica, sendo obtido suspensão de nanofibras com 86% de celulose e 14% de hemicelulose. Esta polpa branqueada foi dispersada em água destilada e homogeneizada em liquidificador laboratorial para obtenção de uma pasta "fluffy". Para o processo de desfibrilação, esta pasta na concentração 3% em base seca, foi inserida no moinho Super Masscolloider Masuko Snagyo, sob rotação de 1.500 rpm e 20 passes, sendo o passe um ciclo de moagem da pasta. As membranas foram produzidas por meio de filtração em telas de náilon de abertura de 22 µm. As massas das suspensões necessárias para obter cada filme foram diluídas em água destilada até a concentração de 3x10<sup>-3</sup>g/ml e agitadas para a completa homogeneização. Em seguida, o excesso de água foi retirado por compressão do filme em placas de vidro e secagem por 24 h em estufa a 60° C. Os filmes foram produzidos com a gramatura objetivada de 40 g/m<sup>2</sup> e diâmetro de 100 mm (Figura 1). Foram realizadas pequenas perfurações nos filmes de celulose com agulha de calibre 18G. Antes de serem aplicadas sobre as feridas dos animais, as membranas foram esterilizadas

em autoclave a 121° C por 30 min que, nestas condições, o filme de celulose não sofre alterações nas propriedades físicas<sup>7</sup>.

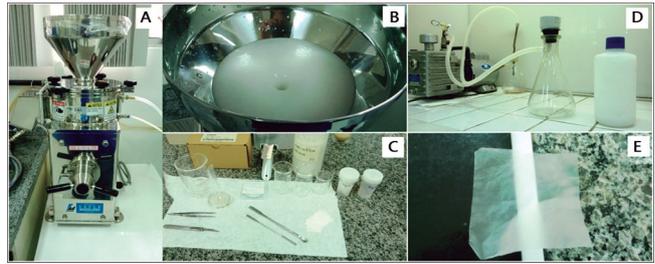


FIGURA 1 - Etapas da produção das nanofibras de celulose vegetal: A) moinho Mass Colloider Masuko; B) suspensão de celulose sendo processada pelo moinho; C) utensílios usados para produção de suspensão de celulose nanofibrilada; D) filtração a vácuo para produção das membranas; E) filme produzido translúcido.

### Animais utilizados e cuidados gerais

Foram estudados 33 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus albinus*) machos adultos, com 200 dias de idade e peso oscilando entre 450-500 g. Inicialmente, eles permaneceram por período de adaptação e observação do estado de saúde de 20 dias, a fim de garantir a ausência de doenças. Receberam livre acesso à água e ração padrão. Foram mantidos em temperatura ambiente controlada entre 18-22° C, nas condições próprias de umidade do ambiente e controle cíclico de luz e escuridão a cada 12 h. Permaneceram em gaiolas individuais de polipropileno com 41x34x18 cm<sup>3</sup>, forradas com maravalha e etiquetadas para identificação.

### Delineamento experimental

Todos foram pesados em balança digital Bramed® e distribuídos aleatoriamente em três grupos (n=11): grupo 1 – controle, com queimadura de terceiro grau, desbridamento cirúrgico e aplicação de curativo somente com gaze; grupo 2 – membrana de celulose bacteriana, com queimadura de terceiro grau, desbridamento cirúrgico e aplicação da membrana de celulose bacteriana (Membracel®); grupo 3 – membrana de celulose vegetal, queimadura de terceiro grau, desbridamento cirúrgico e aplicação da membrana de celulose vegetal.

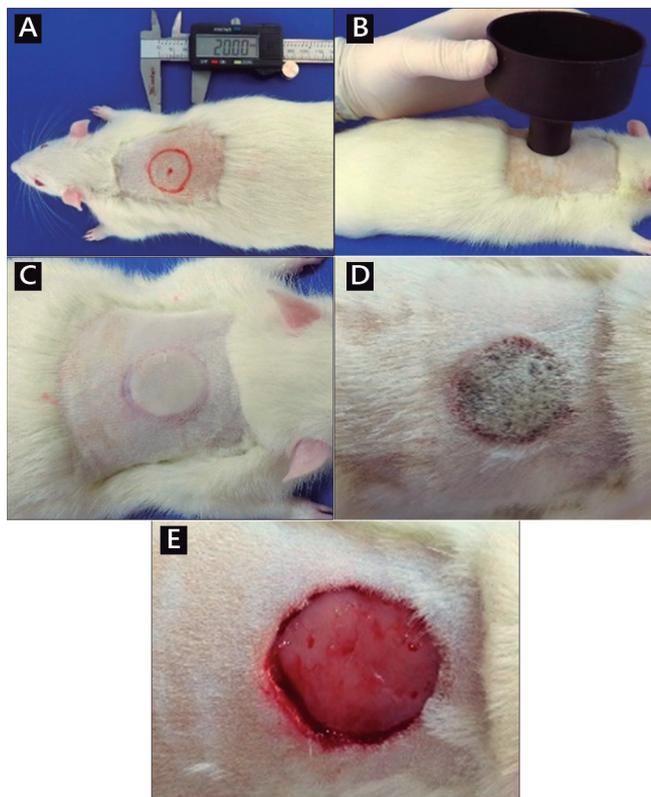
### Anestesia

Todos permaneceram em jejum alimentar de 6 h e jejum hídrico de 2 h. Efetuou-se a injeção intraperitoneal com cloridrato de quetamina na dose de 90 mg/kg, associado ao cloridrato de xilazina na dose de 10 mg/kg. Durante todo o período anestésico, foram observadas as frequências cardíaca e respiratória, além da movimentação voluntária dos ratos, com vistas a detectar complicações ou manifestações de dor para suplementar a anestesia com doses novas. Os animais eram considerados anestesiados e prontos para o procedimento quando perdiam os reflexos ocular e caudal.

### Indução das queimaduras

Após a anestesia, foram posicionados em decúbito ventral e imobilizados em prancha cirúrgica para a realização da tricotomia na região dorsal, com depilador elétrico. A região a ser tricotomizada foi demarcada a 7 cm da ponta nasal do animal, no sentido craniocaudal (Figura 2A) e a partir deste ponto, realizada em uma área de 5x3 cm<sup>2</sup>.

O local da indução da queimadura foi previamente marcado com caneta Sharpie®, utilizando um molde circular de plástico de 2 cm de diâmetro que foi posicionado no centro da área tricotomizada (Figura 2A). Após a marcação, realizou-se a antisepsia com solução de iodopolividona 10 seguida por solução alcoólica de iodo a 2%.



**FIGURA 2** – A) Marcação da área da queimadura: área circular em vermelho representando local padronizado para indução da queimadura em todos os animais; B) posicionamento do dispositivo para escaldadura; C) aspecto da lesão imediatamente após a indução da queimadura: observar área de pele pálida, circundada por halo hiperêmico; D) área desvitalizada com tecido necrosado dois dias depois; E) ferida viva resultante de desbridamento cirúrgico

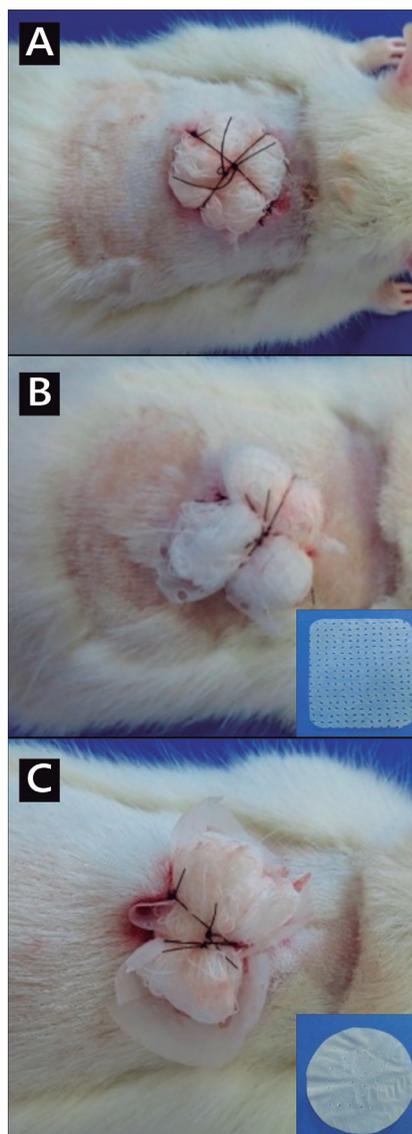
As queimaduras foram realizadas por escaldadura. Dentro de um recipiente de becker, a água foi aquecida a temperatura de 98,4° C, aferida com termômetro digital. Para a delimitação da escaldadura, foi utilizado um dispositivo do tipo funil de polipropileno. O dispositivo foi pressionado sobre o dorso do animal, ficando com a abertura menor, de 2 cm de diâmetro, em contato com a pele (Figura 2B). O funil foi então preenchido com 20 ml de água em ebulição. Foram marcados 30 s com cronômetro digital e, posteriormente, retirou-se o dispositivo cuidando para que a água não escorresse para outras partes do corpo. A forma de indução da queimadura foi a mesma em todos os animais, obtendo lesões circulares com 3,14 cm<sup>2</sup> de área (Figura 3C). Após a indução das queimaduras, as lesões foram mantidas abertas nos animais dos três grupos, permitindo visualização da evolução da ferida.

#### Desbridamento das feridas e aplicação dos curativos

No segundo dia da queimadura, posteriormente à nova indução anestésica (descrita anteriormente), foi realizado o desbridamento cirúrgico da ferida por meio de excisão da área necrosada com lâmina de bisturi número 15 Feather® (Figuras 2D e 2E). Após excisão do tecido desvitalizado, procedeu-se a aplicação dos curativos e membranas designados anteriormente para cada grupo.

Para evitar a retirada das membranas por tentativa das patas e boca dos animais, optou-se pela realização de um curativo secundário, sob técnica de Brown. Foram confeccionados quatro pontos simples equidistantes (náilon 4-0) na borda da lesão. Os fios foram mantidos com 6 cm de comprimento. Posicionou-se uma gaze dobrada sob a lesão e então, confeccionaram-se nós entre dois fios opostos, formando um "X" (Figura 3A).

No grupo 1, o leito da ferida foi coberto somente com gaze e posteriormente, confeccionou-se o curativo de Brown (Figura 3A).



**FIGURA 3** – Procedimentos protegidos com curativo secundário de Brown (notar aspecto em "X" amarelo dos nós, após confecção do curativo): A) somente de gaze (grupo 1 - controle); B) Membracel® (grupo 2); C) membrana de celulose vegetal (grupo 3)

No grupo 2, foram aplicadas as membranas bacterianas (Membracel®, Figura 3B), deixando 0,5 cm excedente em relação ao tamanho da ferida. Em seguida, foi realizado o curativo de Brown (Figura 3B).

No grupo 3 foram aplicadas as membranas de celulose vegetal (Figura 3C), com 0,5 cm excedente em relação ao tamanho da ferida. Em seguida, foi realizado o curativo Brown (Figura 3C).

Os animais foram acompanhados diariamente durante 15 dias para verificação de parâmetros clínicos sistêmicos e aspectos locais da ferida.

Ao terceiro dia após a aplicação das membranas, os curativos de Brown foram retirados e realizou-se a limpeza das feridas, com solução de iodopolividona.

#### Cuidados clínicos

Após os procedimentos cirúrgicos, os animais ficaram em observação durante a recuperação anestésica, sendo mantidos aquecidos em placas térmicas. A analgesia foi feita por meio de administração de cloridrato de tramadol na dose de 5 mg/kg, a cada 12 h, durante os cinco primeiros dias após a queimadura e o desbridamento.

### Parâmetros avaliados após os procedimentos

Todos os animais foram avaliados diariamente, com vistas a detectar alterações locais e sistêmicas decorrentes do procedimento. Os parâmetros clínicos avaliados foram: estado geral (movimentação, estado de alerta e responsividade ao ambiente); apetite; variação ponderal durante o período de acompanhamento; e mortalidade.

### Aspectos macroscópicos

Para avaliar sinais de reação alérgica, inflamação, infecção ou outras complicações locais, as feridas foram examinadas diariamente. Os aspectos macroscópicos avaliados foram: sangramento; sinais flogísticos (rubor, calor, dor, edema); exsudato; formação de abscessos; e presença de tecido necrótico (crostas).

Além desses parâmetros, no último dia da pesquisa (15º dia), realizou-se a mensuração da lesão de cada animal com auxílio de um paquímetro digital Zaus Precision®. Foram obtidas as medidas dos diâmetros das lesões para posterior cálculo de sua área final.

A partir da área da ferida, foi calculada a porcentagem de contração da lesão, como proposto por Agren et al<sup>2</sup>, em que a porcentagem de contração (PC) consiste no resultado da área final (AF) menos a área inicial (AI), dividido pela área inicial e multiplicado por 100.

$$\text{Porcentagem de contração (PC)} = \frac{\text{Área Final (AF)} - \text{Área Inicial (AI)} (\text{mm}^2)}{\text{Área inicial (AI)} (\text{mm}^2)} \times 100(\%)$$

### Análise microscópica

Ao 15º dia após a queimadura, os ratos foram eutanasiados por sobredose anestésica. Em seguida, retirou-se um fragmento transversal da lesão, no sentido craniocaudal, para análise histológica. Os espécimes foram acondicionados em frascos contendo formalina a 10% por 48 h. Após esse período, os fragmentos foram encaminhados ao Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade Evangélica Mackenzie. As lâminas foram preparadas com cortes de 4 µm e coradas com H&E e picosírius red.

Para a análise histológica, foram considerados o grau de cicatrização (1, 2, 3 e 4) e a porcentagem de colágeno tipo I e tipo III. Para essas avaliações, as imagens das lâminas coradas com H&E foram obtidas por meio de fotomicroscópio óptico multi-cabeças Olympus BX 50 e analisadas pelo software Axiovision (Carl Zeiss®).

Na análise do grau de cicatrização, foi utilizada a tabela comparativa de Greenhalgh et al<sup>10</sup>, que classifica cada grau de acordo com a intensidade de tecido de granulação, quantidade de células inflamatórias e fibroblastos, bem como neovascularização e epitelização.

As lâminas coradas com picosírius red foram observadas ao microscópio óptico sob luz polarizada, para determinar a concentração de fibras colágenas do tipo I e tipo III na área correspondente à cicatriz.

As imagens digitalizadas das cicatrizes visualizadas com a lente polarizadora foram submetidas ao programa Image Pro Plus 4.5®, que reconheceu regiões coradas de cor avermelhada e fibras espessas (colágeno tipo I - maduro) e de cor esverdeada e fibras finas (colágeno tipo III - imaturo), calculando a concentração destes subtipos de colágeno na área estudada.

### Análise estatística

Os resultados das variáveis quantitativas foram descritos por média ± desvio padrão da média. Variáveis categóricas foram descritas por frequência e percentual.

Para a comparação entre os grupos em relação às variáveis quantitativas, foi usado o modelo de análise da variância (ANOVA) com um fator e o teste LSD (least significant difference) para comparações múltiplas post-hoc. Para a análise do peso final e da variação ponderal, foi usado o modelo de análise de covariância (ANCOVA) ajustando-se para o peso inicial. Variáveis categóricas foram analisadas considerando-se o teste de qui-quadrado e o ajuste de modelos de regressão logística. Foram considerados

significativos os valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados com o programa computacional Stata/SE v.14.1. StataCorpLP, USA.

## RESULTADOS

### Avaliação clínica

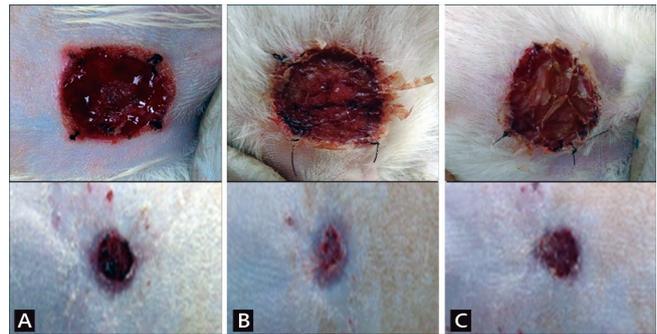
Os animais mantiveram-se clinicamente bem e ativos durante todo o experimento, apresentando apetite, comportamento, fezes e urina normais. A anestesia e os procedimentos cirúrgicos evoluíram sem maiores intercorrências. Um rato do grupo controle morreu no primeiro dia da pesquisa, durante a indução anestésica e não foi substituído no experimento.

### Variação ponderal

Os valores médios da variação de peso dos animais dos três grupos mostraram não haver diferença estatística na variação ponderal entre os grupos ( $p = 0,952$ ) no período estudado.

### Avaliação macroscópica

Procedeu-se a retirada dos curativos secundários de Brown nos animais dos três grupos. Nos grupos 2 e 3 (membranas de celulose), as remoções não apresentaram dificuldades e não houve sangramentos. Observou-se que as membranas vegetal e bacteriana encontravam-se no leito da lesão, impedindo as gazes do curativo secundário de aderir à ferida e causar sangramentos. Já nos animais do grupo controle, a gaze encontrava-se aderida diretamente ao leito da lesão, ocasionando sangramento e posterior formação de crosta em seis animais (60%, Figura 4).



**FIGURA 4** - Aspecto das lesões após retirada dos curativos secundários (em cima) e no término da pesquisa (em baixo): A) grupo 1 controle; B) grupo 2; C) grupo 3. Nota-se em cima que em ambos grupos 2 e 3 ocorreu proteção do leito da ferida e não houve sangramento como visto em A.

Durante toda a pesquisa não foram observados sinais de infecção ou formação de abscessos nas feridas dos animais dos três grupos.

Ao fim do estudo, 15 dias após as queimaduras, todas as membranas haviam se auto destacado da lesão e não foram mais observados sinais da presença delas nos grupos 2 e 3. As feridas dos três grupos mantiveram-se avermelhadas e cobertas por tecido de granulação (Figura 4).

### Contração cicatricial

A Tabela 1 mostra os valores da área final das feridas, contração cicatricial absoluta, bem como a taxa de contração cicatricial de cada grupo, após o período de acompanhamento.

Ao final da pesquisa, as lesões tratadas com as membranas vegetal e bacteriana evoluíram com as maiores taxas de contração, apresentando feridas com áreas menores do que o grupo controle.

Comparando as medidas de área final das feridas, contração cicatricial absoluta e taxa de contração, não observou-se diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**TABELA 1** - Valores da área da ferida (mm<sup>2</sup>), contração cicatricial absoluta (mm<sup>2</sup>) e porcentagem de contração cicatricial

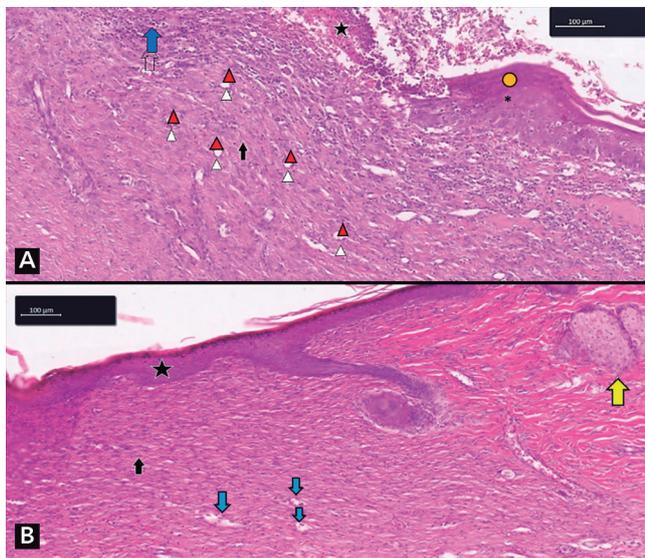
Variáveis	Grupo	Média±desvio-padrão	p*
Área	1	40,0±16,7	0,447
	2	28,8±14,4	
	3	34,7±26,4	
Contração (AI (314 mm) - AF)	1	274,0±16,7	0,346
	2	285,2±14,4	
	3	275,1±24,9	
Taxa contração	1	87,3±5,3	0,347
	2	90,8±4,6	
	3	87,6±7,9	

\*ANOVA com um fator, p<0,05; AI – área inicial; AF – área final

### Análise microscópica

#### Graus de cicatrização

Em todos os grupos observou-se grau avançado de cicatrização. As feridas apresentavam-se parcial ou totalmente epitelizadas, preenchidas por tecido de granulação espesso e neovascularização presente. Nos animais dos grupos 2 e 3, mais de 60% das feridas encontrava-se em grau III de cicatrização (Figura 5A). Nos animais do grupo controle (5B), houve predomínio de feridas no grau IV de cicatrização.



**FIGURA 5** - Fotomicrografia de corte histológico corado em H&E cicatrização grau III A) animal do grupo 3 - células inflamatórias e infiltrado misto com linfócitos e neutrófilos (seta azul); vasos sanguíneos (cabeças de seta vermelha); fibroblasto (seta preta); epitélio em regeneração (círculo amarelo); presença de crosta (estrela) (40 x); B) cicatrização grau IV animal do grupo controle - tecido cicatricial à esquerda, com vasos e tecido fibrocolagenoso mais maduro, raras células inflamatórias e recoberto pela epiderme; tecido não lesionado à direita, mais eosinofílico, menos celular e com anexos cutâneos; glândula sebácea (seta amarela); epitélio cobrindo tecido de granulação (estrela); vasos sanguíneos (setas azuis); fibroblastos (seta preta) (40 x)

Na Tabela 2 estão apresentadas as frequências e percentuais dos graus de cicatrização (I a IV) obtidos nos animais dos grupos 1, 2 e 3.

#### Porcentagem de colágeno tipos I e III

As porcentagens de colágeno tipo I e III obtidas em cada grupo estão relacionadas na Tabela 3. A proporção de colágeno tipo I e tipo III foi homogênea nos três grupos, observando-se colagenização moderada a abundante, predominantemente de colágeno maduro. Observação: os percentuais de colágeno I e III somam 100%, sendo assim, os valores de p dos testes estatísticos são iguais.

**TABELA 2** - Frequência absoluta e relativa dos graus de cicatrização nos grupos 1, 2 e 3 após o período de acompanhamento

Grau de cicatrização	Grupo		
	Controle	Membracel®	Membrana vegetal
I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	2 (20,0%)	0 (0,0%)	2 (18,2%)
II	1 (10,0%)	8 (72,7%)	7 (63,6%)
	7 (70,0%)	3 (27,3%)	2 (18,2%)

Grau 1 – Ausência de tecido de granulação; grau 2 – tecido de granulação escasso e imaturo, epitelização mínima; grau 3 – tecido de granulação médio, neovascularização, epitelização moderada; grau 4 – tecido de granulação abundante e bem vascularizado, epitelização abundante.

**TABELA 3** - Porcentagem de colágeno tipo I e III nas feridas dos animais dos grupos 1, 2 e 3 ao término da pesquisa

Variáveis	Grupo	Média±desvio-padrão	p*
Colágeno I	1	72,3 ± 16,0	0,135
	2	78,6 ± 11,7	
	3	68,0 ± 15,5	
Colágeno III	1	27,7 ± 16,0	0,135
	2	21,4 ± 11,7	
	3	31,9 ± 15,5	

\* Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, p<0,05

## DISCUSSÃO

### Amostra

O rato Wistar foi escolhido para o estudo por se tratar de um animal de fácil manipulação experimental. Além da grande resistência a infecções e da anatomia e fisiologia bem conhecidas, ele permite a padronização em relação a idade, peso, sexo e alimentação. Em estudo de 2014, Abdullahi et al<sup>1</sup> explicaram a necessidade do uso de modelos animais para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos das queimaduras e avaliar o efeito de novas terapêuticas. Desse modo, a presente pesquisa testou uma membrana de celulose de origem vegetal para verificar sua influência no processo cicatricial de queimaduras em animais. Devido ao metabolismo acelerado, as fases da cicatrização são mais curtas nos ratos quando comparadas aos seres humanos, o que permite pesquisadores obterem resultados mais rapidamente em estudos que envolvam processos cicatriais<sup>1</sup>. Outras vantagens preponderantes para escolha deste animal foram o pequeno porte (menor quantidade de membrana utilizada), custo reduzido e a disponibilidade.

A principal desvantagem do uso de ratos como modelos experimentais são as diferenças anatômicas com a pele humana, como a distribuição dos folículos pilosos e presença do músculo panículo carnoso nos roedores. Este músculo leva à cicatrização basicamente por contração, diferente da epitelização que predomina nos humanos<sup>6</sup>. Além disso, não há aderência firme da pele dos ratos com as estruturas subjacentes à ela<sup>1</sup>.

Segundo Coelho et al<sup>7</sup>, aproximadamente 80% das pesquisas médicas utilizam roedores como animais de experimentação e no caso de pesquisas experimentais que envolvam queimaduras e cicatrização, este é um dos modelos que confere melhores resultados.

### Indução da queimadura

Os modelos experimentais são essenciais para testar terapêuticas antes de introduzi-las ao uso clínico. Na avaliação de novos tratamentos para queimaduras, é importante que o modelo utilizado permita criar lesões uniformes e reproduzíveis<sup>28</sup>.

As técnicas utilizadas para gerar queimaduras em modelos experimentais incluem líquidos aquecidos, instrumentos

incandescentes e eletricidade<sup>15</sup>. No presente estudo foi realizada a escaldadura com água fervente, que representa a principal causa de queimaduras em crianças<sup>12</sup>.

Em revisão sistemática de 2012, Mitsunaga Junior et al<sup>15</sup> mostraram que 55,1% dos estudos realizaram tricotomia antes das queimaduras. Semelhante a estes estudos, a presente pesquisa também realizou tricotomia. Em 2014, Cai et al<sup>6</sup> ressaltaram que a fase em que se encontra o desenvolvimento do pêlo (catágena e telógena) pode influenciar na profundidade da lesão adquirida.

O dorso do rato foi o local definido para realizar a queimadura, permitindo a padronização do processo de cicatrização. Segundo relataram Cai et al<sup>6</sup>, feridas situadas em áreas diferentes do corpo cicatrizam de formas distintas. Além disso, no dorso a ferida fica mais protegida de traumas adicionais, pois é de difícil acesso pela boca e patas do animal<sup>15</sup>.

Fantinati et al<sup>8</sup> utilizaram um dispositivo de cilindro plástico resistente a altas temperaturas e expuseram o animal a líquido quente para obter queimaduras de 3º grau no dorso dos murinos. Coelho et al<sup>7</sup>, realizaram queimaduras de segundo grau profundo, depositando água fervente em seringa cortada de 20 ml, que foi mantida em contato com a pele do rato durante 20 s. Semelhante a estes estudos, a presente pesquisa também utilizou um dispositivo para realizar a queimadura, mas em formato de funil, feito de material resistente a altas temperaturas. Este dispositivo mostrou-se mais prático e seguro do que a seringa para a colocação da água fervente no dispositivo, diminuindo o risco do líquido escorrer e queimar a mão do pesquisador.

Para obter lesões de 3º grau, a água foi aquecida a 98º C e permaneceu por 30 s em contato com a pele. A região exposta à água fervente apresentou aspecto branco nacarado, característica macroscópica de queimaduras de espessura total. O presente modelo mostrou-se prático e eficaz para indução de queimaduras de 3º grau em pele de ratos, sendo possível sua reprodução.

### Tratamento cirúrgico das queimaduras

#### *Desbridamento*

Segundo Phelan et al<sup>18</sup>, a excisão precoce do tecido necrótico e fechamento da ferida constituem um dos maiores avanços no tratamento das queimaduras severas. A excisão reduz a bacteremia, a produção de endotoxinas e a liberação de mediadores inflamatórios<sup>17</sup>. Isso reduz as chances de sepse e falência de múltiplos órgãos, principais causas de morte em queimaduras graves. O período mais adequado da excisão ainda é controverso. Na presente pesquisa, optou-se por realizá-la 48 h após a injúria térmica, corroborando estudo de Phelan et al<sup>18</sup> que cita que idealmente, a excisão deve ser realizada dentro de 24-72 h após a queimadura.

Após a excisão, é realizada enxertia de pele simultaneamente, caso esteja disponível. Em alguns casos, curativos temporários ou outras alternativas (substitutos de pele) são necessários até que reconstrução definitiva seja realizada<sup>18</sup>. A proposta deste estudo foi direcionada a investigar a eficácia das membranas de celulose vegetal como curativos biológicos naturais para o tratamento de queimaduras de 3º grau e verificar seu efeito sobre o reparo tecidual.

#### *Membranas de celulose*

Estudos sobre o efeito das membranas de celulose no tratamento de queimaduras aumentaram nos últimos anos, principalmente sobre lesões de 2º grau. Muangman et al<sup>16</sup> apresentaram a contribuição das membranas bacterianas ao processo de cicatrização de queimaduras de 2º grau em face. Coelho et al<sup>7</sup> realizaram estudo com membrana vegetal em lesões de 2º grau profundo em ratos e obteve resultados semelhantes aos da membrana bacteriana comercializada no Brasil (Membracel®).

Estudos envolvendo o uso de celulose vegetal em cicatrização ainda são escassos. Essa é uma das primeiras pesquisas a avaliar a ação das nanofibras vegetais, originadas de pinus, no processo

de cicatrização tecidual, sendo o primeiro estudo na literatura a utilizar este produto no tratamento de queimaduras de 3º grau.

Uma das principais vantagens das membranas bacterianas é sua capacidade de aderência e adaptação ao leito das feridas, inclusive na face e locais de mobilidade<sup>9</sup>. Além disso, sua transparência facilita a avaliação diária das lesões<sup>19</sup>. Estudos mostraram que estas características também foram mantidas nas membranas de pinus. A Membracel® possui poros com memória de posição, que não mudam de diâmetro com o passar do tempo e permitem a livre passagem do excesso de secreções<sup>29</sup>. Em função disso, foram realizadas perfurações na membrana estudada, criando poros artificiais para a passagem do exsudato. Entretanto, trata-se de um produto em fase de testes e ainda não comercializado. Assim, são necessárias mais pesquisas antes de padronizar esses aspectos da membrana, como espessura, tamanho e formato dos poros.

### Avaliação clínica

Após a aplicação das membranas, não foram observadas complicações locais e sistêmicas nos animais. O ganho ponderal foi uniforme em todos os grupos e dentro do esperado para a espécie, demonstrando que o apetite manteve-se adequado e que a membrana estudada não provocou desconforto ou piora do estado geral. Isso sugere a segurança clínica dos produtos testados. Esses dados são compatíveis com Hakkarainen et al<sup>11</sup> e Coelho et al<sup>7</sup> que testaram membranas de celulose de origem vegetal em feridas no dorso de ratos e comprovaram a biocompatibilidade e atoxicidade do material.

As membranas foram cobertas com curativo secundário, feito com gaze fixada com pontos de náilon entrelaçados na pele - curativo de Brown - para evitar que os ratos retirassem as membranas, ocasionassem traumas adicionais com a boca e patas, e que a maravalha da caixa aderisse à ferida. O presente estudo foi semelhante ao realizado por Ramalho et al<sup>25</sup>, que utilizaram com sucesso este tipo de curativo para cobrir e proteger enxertos de pele no dorso de ratos.

Não foram observadas infecções e inflamações com o uso do curativo de Brown no presente estudo.

### Avaliação macroscópica

Embora sem diferença estatística, a análise destas medidas permitiu verificar a velocidade de cicatrização, que mostrou ser mais rápida nos grupos 2 e 3, e também calcular a área final da queimadura. A média das áreas finais dos grupos tratados com as membranas de celulose mostrou-se menor do que no grupo controle. A taxa de contração das lesões dos grupos 2 e 3 foram maiores do que no controle, revelando cicatrização mais rápida nestes grupos. Estes resultados corroboram os encontrados por Hakkarainen et al<sup>11</sup>, que observaram cicatrização mais acelerada com o uso de membranas de celulose em áreas doadoras de enxertos, quando comparadas com outro curativo usado no tratamento de queimaduras. Coelho et al<sup>7</sup> refere que a membrana de celulose funciona como meio de crescimento e aderência de células epiteliais, favorecendo sua migração até o centro da lesão e, conseqüentemente, o fechamento da ferida.

Na presente pesquisa, os animais não apresentaram sinais de sensibilidade local, como edema, rubor, dor ou prurido após a aplicação da membrana vegetal. Estes resultados também são compatíveis com os encontrados por Coelho et al<sup>7</sup>. Brassolatti et al<sup>5</sup> explicaram que biomateriais de celulose bacteriana diminuem a resposta inflamatória, quando comparadas aos enxertos convencionais em feridas de pele total de ratos. Muangman et al<sup>16</sup> aplicaram o curativo bacteriano em paciente de 54 anos com queimadura superficial e não observaram sinais de irritação na pele ou reações alérgicas. No caso das membranas vegetais, Hakkarainen et al<sup>11</sup> fizeram testes in vivo em ratos e, após comprovação da segurança do material, realizaram estudos clínicos em áreas doadoras de enxerto de nove pacientes e nenhum efeito adverso foi constatado.

Durante a manipulação das lesões, observou-se maior dificuldade para retirar o curativo de gaze nos animais do grupo controle, uma vez que ela se encontrava aderida ao leito da ferida, provocando sangramento e formação de crostas. Esses dados corroboram o estudo de Rogers et al<sup>27</sup>, que mostraram que as gazes favorecem o ressecamento local e causam forte aderência ao leito da lesão, provocando dor ao serem retiradas, além de remover tecidos cicatriciais neoformados. Tradicionalmente, as gazes são utilizadas como material de curativo devido à sua alta permeabilidade, absorvendo fluidos secretados pela lesão<sup>11</sup>.

Por outro lado, Barud et al<sup>3</sup> explicam que as membranas se aderem bem ao leito da ferida e favorecem a manutenção da umidade local, formando uma barreira entre a lesão e o meio. Isso permite a troca de curativos secundários com menor dificuldade e dor. De modo similar, nos animais dos grupos 2 e 3 (com membranas), os curativos secundários também foram retirados facilmente, sem sangramentos e sem remover o tecido de granulação.

Não foram observados sinais de infecção, exsudato purulento ou formação de abscessos nas lesões dos grupos tratados com ambas as membranas de celulose. No entanto, não se pode afirmar que a membrana evitou infecções, já que não foram realizadas culturas de microorganismos. Powell et al<sup>22</sup> realizaram estudo in vitro que demonstrou que a membrana celulose vegetal foi eficaz para inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, Hakkarainen et al<sup>11</sup> relataram que suspensões bacterianas de *S.aureus* e *Paeruginosa* não tiveram seus crescimentos afetados pela celulose vegetal, sugerindo que o material em si, não tem propriedades antibacterianas. Rajwade et al<sup>24</sup> referem que a membrana atua como barreira física entre a ferida e o meio e por isso, previne a ocorrência de infecções.

#### Avaliação microscópica

Na análise por H&E, observou-se predomínio de tecido rico em fibroblastos e colágeno, assim como neovascularização e epitélio em regeneração ou neoformado nos animais dos três grupos. Em todos os animais do grupo tratado com Membracel®, as feridas encontravam-se em fases avançadas do processo cicatricial (grau III e IV), também observado por Lin et al<sup>13</sup>. Nos grupos 1 e 3, a maioria das lesões também se mostraram em graus avançados, mas aproximadamente 20% ainda estavam em grau II de cicatrização.

A coloração picrosírius red foi utilizada para verificar a área e densidade do colágeno total, além da diferenciação das fibras jovens e maduras. A derme sadia contém aproximadamente 80% de colágeno tipo I (maduro) e 20% do tipo III (imaturado); já o tecido de granulação expressa 30-40% de colágeno tipo III<sup>26</sup>.

No presente estudo, não foi observada diferença estatística na proporção de colágenos entre os três grupos, semelhante a pesquisa de Brassolatti et al<sup>5</sup>, que também não encontraram diferenças na porcentagem das fibras colágenas de grupos tratados com membranas de celulose em relação ao controle. Diferente ao relatado por Yaguishita et al<sup>29</sup>, que observou maior proporção de colágeno maduro nos animais tratados com Membracel® em comparação aos animais do grupo controle, essa diferença pode ter ocorrido em função do tipo de lesão avaliada. Enquanto o presente estudo avaliou queimaduras, Yaguishita et al<sup>29</sup> produziram feridas retirando fragmento de pele com bisturi, o que pode ter influenciado no processo cicatricial. Além disso, eles avaliaram os grupos semanalmente, com 7, 14, 21 e 28 dias, enquanto que, no presente estudo, foi feita a avaliação microscópica apenas no 15º dias.

Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística na análise microscópica entre os três grupos, na análise macroscópica as membranas de celulose mostraram-se mais eficazes por minimizar a formação de crostas, a dor e o sangramento durante as trocas de curativo. Devido ao rápido metabolismo dos ratos, aos 15 dias de acompanhamento, as feridas dos três grupos apresentavam tamanho semelhante. Entretanto, é possível observar fechamento mais rápido e uniforme em feridas tratadas

com as membranas de celulose, como já observado em vários outros trabalhos<sup>7,11,29</sup>.

#### Perspectivas futuras

Pesquisas envolvendo nanotecnologia e nanomateriais têm introduzido novos horizontes terapêuticos na área médica, produzindo materiais bioativos para o tratamento de feridas.

Curativos produzidos a partir de nanocelulose vegetal têm apresentado eficácia semelhante à da celulose bacteriana em vários estudos. O menor custo de produção da celulose vegetal, aliado a maior disponibilidade de matéria prima, possibilitam sua produção em larga escala, permitindo a disponibilização deste recurso para um número maior de pacientes.

Os resultados deste estudo contribuem para melhorar o conhecimento sobre as nanofibras de celulose vegetal como alternativa terapêutica no tratamento de queimaduras profundas.

Novas pesquisas se fazem necessárias para consolidar os resultados obtidos e verificar outros aspectos pertinentes ao uso da membrana de celulose vegetal, como ação antibactericida e resposta inflamatória sistêmica.

## CONCLUSÕES

Ambas as membranas de celulose – vegetal e bacteriana – são: 1) seguras clinicamente para o tratamento de queimaduras de 3º grau em ratos; 2) a evolução macroscópica das feridas foi semelhante entre os grupos tratados com elas, sendo superior ao grupo controle; 3) a avaliação microscópica não mostrou diferença significativa entre os grupos tratados com membranas de celulose bacteriana e vegetal em relação ao controle.

## REFERÊNCIAS

1. Abdullahi, A.; Amini-nik, S.; Jeschke, M. G. Animal models in burn research. *Cell mol life sci*, 71, n. 17, p. 3241-3255, sep 2014.
2. Agren, M. S.; Mertz, P. M.; Franzén, I. A comparative study of three occlusive dressings in the treatment of full-thickness wounds in pigs. *J am acad dermatol*, 36, n. 1, p. 53-58, jan 1997.
3. Barud, H. G. O et al. A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: bacterial cellulose. *Carb polymers*, 153, p. 406-420, jul 2016.
4. Bolina-matos, R.S. et al. Efeitos da biomembrana de látex natural (*hevea brasiliensis*) em pele de ratos wistar submetidos à lesão térmica corporal por escaldamento. *Rev bras queim*, 12, n.4, p. 270-277, 2013.
5. Brassolatti, P.; Kido, H.W.; Bossini, P.S.; Gabbai-Armelin, P.R. et al. Bacterial cellulose membrane used as biological dressings on third-degree burns in rats. *Biomed mater eng*, 29, n. 1, p. 29-42, 2018.
6. Cai, E. Z.; Ang, C. H.; Raju, A.; Tan, K. B. et al. Creation of consistent burn wounds: a rat model. *Arch plast surg*, 41, n. 4, p. 317-324, jul 2014.
7. Coelho, G.A. et al. Pinenanocelulose and bacterial nanocelulose dressings are similar in the treatment of second-degree burn? Experimental study in rats. *ABCD, arq. bras. cir. dig.* Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0102-672020200002e1533>, 2020.
8. Fantinati, M. S.; Mendonça, D. E.; Fantinati, A. M.; Santos, B. F. et al. Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. *Acta cir bras*, 31, n. 7, p. 463-471, jul 2016.
9. Fu, I.; Zhang, J.; Yang, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr polym*, 92, n. 2, p. 1432-1442, feb 2013.
10. Greenhalgh, D. G.; Sprugel, K. H.; Murray, M. J.; Ross, R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am j pathol*, 136, n. 6, p. 1235-1246, jun 1990.
11. Hakkarainen, T.; Koivuniemi, R.; Kosonen, M.; Escobedo-lucea, C. et al. Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment. *J control release*, 244, n. Pt b, p. 292-301, 12 2016.
12. Jacomassi, I.S. et al. Queimadura infantil: primeiros cuidados e como evitá-las. *Observatório da saúde da criança e do adolescente*. Disponível em: <https://www.medicina.ufmg.br/observaped/wp-content/uploads/sites/37/2018/10/queimadura-infantil.-informativo-1.2018.pdf>. Acesso em 12 sep, 2019.
13. Lin, W. C.; Lien, C. C.; Yeh, H. J.; Yu, C. M. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydr polym*, 94, n. 1, p. 603-611, apr 2013.

14. Mendonça, I. M. Crianças de adolescentes seguros. Guia completo para prevenção de acidentes e violências. Sociedade Brasileira de pediatria, 2005.
15. Mitsunaga Junior, J. K.; Gragnani, A.; Ramos, M. L.; Ferreira, I. M. Rat an experimental model for burns: a systematic review. *Acta cir bras*, 27, n. 6, p. 417-423, jun 2012.
16. Muangman, P.; Opananon, S.; Suwanchot, S.; Thangthed, O. Efficiency of microbial cellulose dressing in partial-thickness burn wounds. *J am col Certif wound spec*, 3, n. 1, p. 16-19, mar 2011.
17. Ong, Y. S.; Samuel, M.; Song, C. Meta-analysis of early excision of burns. *Burns*, 32, n. 2, p. 145-150, mar 2006.
18. Phelan, H. A.; Bernal, E. Treatment of deep burns. Uptodate literature review current through, 2019. This topic last updated: apr 27, 2018.
19. Picheth, G. F.; Pirich, C. L.; Sierakowski, M. R.; Woehl, M. A. *et al*. Bacterial cellulose in biomedical applications: a review. *Int j biol macromol*, 104, n. Pt a, p. 97-106, nov 2017.
20. Pitanguy, I.; Salgado, F.; Maracajá, P. F. Utilização de película de celulose (biofill®) como curativo biológico. *Rev bras cir*, 78, p. 317-320, 1988.
21. Portela, R.; Leal, C. R.; Almeida, P. L.; Sobral, R. G. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microb biotechnol*, 12, n. 4, p. 586-610, 07 2019.
22. Powell, I. C.; Khan, S.; Chinga-Carrasco, G.; Wright, C. J. *et al*. An investigation of pseudomonas aeruginosa biofilm growth on novel nanocellulose fibre dressings. *Carbohydr polym*, 137, p. 191-197, feb 2016.
23. Purna, S. K.; Babu, M. Collagen based dressings--a review. *Burns*, 26, n. 1, p. 54-62, feb 2000.
24. Rajwade, J. M.; Paknikar, K. M.; Kumbhar, J. V. Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Appl microbiol biotechnol*, 99, n. 6, p. 2491-2511, mar 2015.
25. Ramalho, R. *et al*. Enxerto epidermogorduroso e suas aplicações. *Rev bras cir plást*, 12, p.55-70, 1997.
26. Robson, M. C.; Steed, D. L.; Franz, M. G. Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr probl surg*, 38, n. 2, p. 72-140, feb 2001.
27. Rogers, A. A.; Walmsley, R. S.; Rippon, M. G.; Bowler, P. G. Adsorption of serum-derived proteins by primary dressings: implications for dressing adhesion to wounds. *J wound care*, 8, n. 8, p. 403-406, sep 1999.
28. Venter, N. G.; Monte-Alto-Costa, A.; Marques, R. G. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns*, 41, n. 3, p. 542-547, may 2015.
29. Yaguishita, N. Avaliação da cicatrização induzida pela membrana de celulose porosa depois da retirada total da pele em dorso de ratos. *Jorn vasc bras*, 6, p. 193-194, 2007.
30. World health organization (who). Burns, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>. Acesso em: 26 jul 2018.