



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

JAIURTE GOMES MARTINS DA SILVA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA DA ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA E
INTRAPERITONEAL DO HIDROGEL DE BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR
EM RATOS WISTAR**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JAIURTE GOMES MARTINS DA SILVA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA DA ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA E
INTRAPERITONEAL DO HIDROGEL DE BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR
EM RATOS WISTAR**

TCC apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Flávia Cristina Morone
Pinto

Co-orientador: Olávio Campos Júnior

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Deve ser solicitada à Biblioteca Setorial do CAV após a apresentação e correções finais do trabalho.

JAIURTE GOMES MARTINS DA SILVA

**ANÁLISE TOXICOLÓGICA DA ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA E
INTRAPERITONEAL DO HIDROGEL DE BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR
EM RATOS WISTAR**

TCC apresentado ao Curso de Licenciatura em
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória,
como requisito para a obtenção do título de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Flávia Cristina Morone Pinto (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^º. Dr. René Duarte Martins (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dra. Amanda Vasconcelos de Albuquerque (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deus por ele ser presente na minha vida, por ele me conceder todos os dias o dom de viver e por me proporcionar mais essa conquista.

Aos meus Pais, Jailton Martins e Joseneide Gomes, que mesmo de longe são meus maiores exemplos de vida, minha fonte de amor e alegria para viver.

A minha Bisavó Maria das Dores pela excelente criação, por todo amor, toda força, todas as noites de sono que perdeu para que eu pudesse dormir em paz.

Aos meus irmãos João Victor, Kaio Martins, Talyson Martins e Karolayne.

A minha Família Gomes e Martins por todo amor, apoio, força e ajuda.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu refúgio e fortaleza em todos os momentos da minha trajetória, a Jesus pela força e intercessão, ao Espírito Santo por ser meu melhor amigo e a Nossa Senhora que pelo seu “sim” a Salvação entrou no mundo.

A minha orientadora Prof^a Dra Flávia Morone, pela oportunidade, transmissão de conhecimento, sugestões, críticas, orientação, amizade e apoio. Por ser minha referência de vida profissional e por acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditei. Meu eterno agradecimento.

Ao meu co-orientador Olávio Campos, pela orientação, por acreditar no meu potencial, por toda ajuda neste trabalho e em todos os outros, por ser um líder e amigo que sempre me transmitiu paz e força. Muito obrigado.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Centro Acadêmico de Vitória (CAV) e a FIOCRUZ do Rio de Janeiro pela oportunidade de realizar este trabalho e por todo aprendizado.

A todos os meus professores que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmica e profissional. Em especial as professoras do laboratório de Anatomia do CAV, principalmente as professoras Carolina Peixoto, Lisiane dos Santos, Gêssyca e Laíse. Ao professor René Duarte pela oportunidade, amizade e ajuda. Aos Professores Kênio Lima pelo apoio e força e a Gilmar Beserra por toda oportunidade e conselhos.

Ao laboratório de Anatomia do CAV por ser minha segunda casa, a todos os monitores e estagiários. Em especial ao meu amigo Arthur e Thiago pelos anos de monitoria juntos e Anderson pela contribuição neste trabalho.

As minhas amigas Sidiane Barros, Gislainy Lemos e Silvia Luna, por serem meu ponto de apoio na reta final do curso, por cada oração, desabafo, ombro amigo, fidelidade, momentos de choros e alegrias que nunca serão esquecidos e por me mostrarem o verdadeiro valor da amizade.

Aos amigos de infância, José Adriel e Roberta Talita. Aos meus primos Joalysen Ridyel e Allan Santos, que sempre estão do meu lado em qualquer momento da minha vida. Estaremos sempre juntos.

A Todos os técnicos de laboratório do CAV, em especial a André Pukey por ser como um pai no laboratório e na vida, a Rosane Galvão por toda amizade e conselhos, Ewerton

Fylipe por ser um irmão e por toda ajuda na universidade. Além dos Técnicos Rafael Albuquerque, Anderson Santos, Carlos Renato e Danilo Fontes. Muito obrigado.

A todos os meus amigos da universidade, aos meus monitores pela ajuda, aos alunos da monitoria, seguranças e todos os outros funcionários.

A Thiago Venicius, Anderson Silva, Sidcley e professor Francisco Amanajás pela ajuda na confecção e análises das lâminas histológicas.

A Juliana Arandas, Palloma Dornelas, Jonathan Fernandes, Lenise Nogueira, Cintia, Michelle, Patrícia, Thais Soares, Thais Vasconcelos, Nicássia Lima, Izabela Santos, Euclides, Rodrigo, Giane e Tércia. Vocês são especiais.

Aos Funcionários do HC, Núcleo de Cirurgia Experimental, FIOCRUZ e da Casa Amarela em especial a Amanda Vasconcelos, Veridiana, Rodrigo, Ângela, Rose e aos professores Lamartine, Salvador, Francisco e Leslie pela oportunidade e ajuda.

A minha turma de graduação, que mesmo em meio as brigas e dificuldades criou um vínculo de fraternidade. Muito sucesso a todos.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho ou na minha formação, como pessoa, amigo e profissional, meu muito obrigado.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso. “

John Ruskin

ANÁLISE TOXICOLÓGICA DA ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA E INTRAPERITONEAL DO HIDROGEL DE BIOPOLÍMERO DE CANA DE AÇÚCAR EM RATOS WISTAR

RESUMO

O biopolímero da cana de açúcar (BPCA) é um exopolissacarídeo produzido por via microbiológica, através da bactéria *Zoogloea* sp. utilizando como matéria prima o melaço de cana de açúcar. Estudos anteriores indicam que BPCA tem baixa toxicidade e alta biocompatibilidade, sendo um biomaterial promissor para a área médica. Neste estudo, objetivou-se analisar a toxicidade do hidrogel de biopolímero de cana de açúcar a 0,8% em ratos *Wistar*, por via subcutânea e intraperitoneal. Foram utilizados 48 animais, 24 machos e 24 fêmeas, com idade de 55 dias, que receberam o hidrogel de BPCA à 0,8% por via subcutânea e intraperitoneal. O grupo controle recebeu salina por via intraperitoneal. Todos os animais apresentaram comportamento normal durante o experimento, não havendo diferenças significativas no peso corpóreo entre os grupos. Houve diferença significativa no peso relativo do fígado das fêmeas, entre o grupo tratado com BPCA por via subcutânea e o controle. Observada significância estatística no peso relativo do rim direito de machos do grupo tratado com BPCA por via intraperitoneal, quando comparado ao controle. Foram detectadas alterações histopatológicas no fígado e no rim de animais que receberam o BPCA e, eventualmente, no controle. Conclui-se que o hidrogel de biopolímero de cana de açúcar a 0,8% apresentou leves indícios de toxicidade quando administrados em ratos *Wistar*, por via parenteral (subcutânea e intraperitoneal).

Palavras-chave: Biomaterial. Biopolímero de cana de açúcar. Toxicologia.

TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF THE SUBCUTANEOUS AND INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF SUGAR CANE BIOPOLYMER HYDROGEL IN RATS WISTAR

ABSTRACT

The sugarcane biopolymer is a exopolysaccharide made by microbiological processes, through the *Zoogloea* sp. Bacterium utilizing as feedstock the sugarcane's molasses. Previous studies indicate that sugarcane biopolymer has low toxicity and high biocompatibility, being a promising biomaterial for medical area. This current study aimed to analyze the hydrogel of the sugarcane's biopolymer toxicity at 0.8% in Wistar mice by subcutaneous and intraperitoneal routes. It was used 48 animals, 24 males and 24 females, at the age of 55 days, they received the hydrogel at 0.8% by subcutaneous and intraperitoneal routes. The control group received saline intraperitoneally. All animals exhibit normal behavior during the experiment, with no significant differences in mice's weight between the groups. There was a significant difference in the relative weight of females' liver, between the study group treated subcutaneously and the control group. It was seen statistical significance in the weight of the males' right kidney from the study group with intraperitoneal route, when compared with the control group. Histopathological changes were detected in the liver and kidney of animals that received the sugarcane biopolymer and some mice from the control group eventually. It follows that the hydrogel of sugarcane's biopolymer at 0.8% had mild signs of toxicity in Wistar mice when administered by the parenteral route (subcutaneous and intraperitoneal).

Keywords: Biomaterial. sugarcane biopolymer. Toxicology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
3 OBJETIVOS	14
4 METODOLOGIA.....	15
5 RESULTADOS	19
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	32
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O biopolímero de cana de açúcar (BPCA) é produzido por síntese bacteriana através de microrganismos (*Zoogloea sp*) que possuem a habilidade de sintetizar exopolissacarídeos, quando cultivadas no melaço de cana de açúcar (PATERSON-BEEDLE et al., 2000; COELHO et al., 2002).

O BPCA é composto de açúcares polimerizados estáveis. É uma celulose bacteriana que se emoldura como um biomaterial promissor na área da saúde, devido à sua composição química e propriedades físicas. (PATERSON-BEEDLE et al., 2000; SUGANO et al., 2005).

O BPCA foi eficaz como um condutor de células e indutor na processo de cicatrização (MARTINS et al., 2013; COELHO et al., 2002). Tem sido usado em diferentes áreas de medicina, principalmente na área cirúrgica, tais como reconstrução uretral (LUCENA, 2012), agente de preenchimento para o tratamento de incontinência urinária (LIMA et al., 2015) e da incontinência fecal (CAVALCANTE, 2015), na otorrinolaringologia, em pacientes com perfuração timpânica (SILVEIRA et al., 2016), além de diversas aplicações na cirurgia vascular (MARQUES et al., 2007), na ortopedia (ALBUQUERQUE et al., 2011) e na oftalmologia (CORDEIRO-BARBOSA et al., 2012).

Além do seu potencial terapêutico, o BPCA apresenta propriedades em termos de segurança (CASTRO et al., 2004; PINTO et al., 2015), é biocompatível (PITA et al., 2015) e de baixo custo.

Contudo, considerando suas importantes aplicações, principalmente na área médica, justifica-se que a caracterização do potencial toxicológico do BPCA por via parenteral é relevante e fornecerá subsídios para realização de ensaios clínicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os polímeros são macromoléculas formadas por subunidades moleculares, os monômeros, através do processo de polimerização ou formados a partir de uma reação de condensação. Neste caso, os monômeros são unidos através da eliminação de uma molécula, como de um álcool ou água (UCKO, 1992; SOLOMONS, 2005).

Segundo Ucko (1992), existem polímeros que são sintéticos industriais e possuem grande valor nos cuidados com a saúde, como seringas, frascos e tubos. Também podem ser produzidos a partir de matérias-primas de fontes renováveis, como: milho, celulose e quitinas (ABNT, 2008).

Os biopolímeros são produzidos através de microrganismos que possuem habilidade de sintetizar exopolissacarídeos (COELHO et al., 2002).

Eles são essenciais na produção de biomateriais, cuja finalidade é reparar ou substituir tecidos, órgãos ou funções do organismo, apresentam alto nível de biocompatibilidade e, por isso, não induzem reação indesejável ao corpo (UCKO, 1992; GUASTALDI, 2010).

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) é o biopolímero mais abundante no mundo, ela pode ser encontrada em diferentes formas de vida como em fungos, protozoários, plantas verdes e procariontes e sua produção é estimada de 10^{14} toneladas por ano. Sua estrutura é constituída por unidades de β -D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β -(1 $\rightarrow$ 4) (DONINI, 2010).

Segundo Sugano et al. (2005) a celulose se enquadra como o componente principal da parede celular de plantas, contendo pectina, lignina e hemicelulose, quando relacionada a fins industriais.

Este polímero pode ser dividido em dois grupos: grupo da celulose pura, no qual se encontra a celulose bacteriana e o grupo da celulose complexa (SUGANO et al., 2005).

Mesmo possuindo sua fórmula química igual a da celulose vegetal, a celulose bacteriana possui fibras em dimensões nanométricas, dando assim propriedades distintas. Destacam-se entre essas propriedades a grande resistência mecânica e à tração, dando possibilidade de inserções de matérias para a obtenção de compósitos a base de celulose bacteriana (DONINI, 2010).

Cresce nos últimos anos o interesse pela identificação e isolamento de polissacarídeos microbianos e suas aplicações, como por exemplo: a celulose bacteriana em países na Ásia é usada no ramo alimentício cujas propriedades são diferentes da celulose vegetal e permitindo assim novas utilizações industriais (OKIYAMA, 1992).

No mundo, existem diversas aplicações para a celulose bacteriana, como pele artificial, diafragma acústico, membranas de filtros, fibra dietética, elemento aditivo para papel, entre outros (OKIYAMA, 1992).

Desde 1990 vem sendo realizados estudos na Estação Experimental de Cana de açúcar de Carpina, na Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECC/UFRPE), onde um exopolissacarídeo é obtido pela ação de bactérias do tipo *Zoogloea sp*, cultivadas no melaço de cana de açúcar (ANDRADE & AGUIAR, 2002).

Segundo Castro et. al. (2004), trata-se de um biopolímero com grande histocompatibilidade, sendo constituído de um tecido homogêneo e estável. Além dessas propriedades, o novo material, denominado de “Biopolímero da Cana de Açúcar (BPCA)”, detém um alto grau de elasticidade, pureza, flexibilidade e resistência à tração, podendo ser modelado em diferentes formas, possuindo assim características físico-químicas fundamentais para a sua aplicabilidade em implantes biológicos (ANDRADE & AGUIAR, 2002; LIMA, 2005).

Coelho et. Al. (2002) utilizou a membrana de BPCA em animais domésticos portadores de feridas cutâneas, com intuito de avaliar a reepitelização da área e observou que houve o aumento do tecido de granulação, diminuição do tempo de cicatrização e controle de infecção, concluindo que o biopolímero contribui para a cicatrização em feridas cutâneas.

Também se obteve eficácia na utilização do BPCA por Marques et al. (2007), quando o remendo de biopolímero foi comparado ao e-PTFE utilizado nas reconstruções de artérias. Diferente do e-PTFE que teve invasão de fibroblastos, o remendo de BPCA não permitiu essa penetração, pois não apresentava poros. Observou-se que o remendo apresentou novas camadas íntimas e adventícias, aderidas às faces internas e externas das artérias.

Na área de urologia, o BPCA teve seu uso na bexiga de ratos *Wistar*, na perspectiva de se obter um material com menor reação imunológica após contato com materiais de sutura utilizados em cirurgia urológica. Sendo comparado com poliglactina, um fio de sutura sintética composta de um copolímero de glicolida e L-lactida (Vicryl®), o material teve uma boa integração na bexiga, sendo sua absorção mais lenta nesses ratos e a presença de pedras

urinárias foi menor em bexigas com implantação do BPCA (CARVALHO JUNIOR et al., 2012).

Silveira et al. (2014) mostrou a ação eficaz do BPCA comparando-o com o polipropileno, no tocante a reação inflamatória como opção para correção da incontinência urinária. Lima et al. (2015) avaliou a biocompatibilidade do BPCA como agente de volume na bexiga de coelhos, que apresentou menor resposta inflamatória e se integrou melhor ao tecido hospedeiro do que o grupo tratado com dextranômero (Deflux®).

Por Lucena et al. (2015), o BPCA foi utilizado como um novo material para *sling* suburetral no tratamento da incontinência urinária de esforço. O implante mostrou resultados adequados quando usado como um suporte suburetral, com uma boa integração e boa preservação na região implantada, não havendo alterações morfológicas.

Quando utilizado em forma de gel, o BPCA foi comparado à cicatrização natural em defeitos osteocondrais produzidos em côndilos femorais de coelhos, onde não houve diferenças significantes entre as médias das áreas cicatrizadas nos grupos estudados. Concluindo que a área tratada com BPCA teve resultado semelhante ao grupo controle, cicatrizando naturalmente (ALBUQUERQUE et al., 2011).

O mesmo gel também foi utilizado como agente de preenchimento na submucosa do anorreto, para o tratamento de incontinência fecal após trauma cirúrgico do esfíncter anal em ratos. Um implante com gel de BPCA, se comportou de forma estável e homogêneo, havendo integração ao tecido, apresentando fibroblastos, neovascularização, fibras colágenas e células típicas da resposta inflamatória, incorporando sua matriz de forma centrípeta. O gel de BPCA foi eficaz para elevar as pressões anorretais dos ratos com incontinência fecal induzida (CAVALCANTE, 2015).

Para avaliar a biocompatibilidade do BPCA, inicialmente foi realizado um estudo de citotoxicidade *in vitro* por Castro et. al (2004). Neste estudo, foi comparada a resposta citotóxica de macrófagos alveolares de ratos ao biopolímero com as membranas de PTFE e telas de Polipropileno. Os testes empregados foram a concentração de óxido nítrico, determinação do índice de adesividade e o percentual de viabilidade celular através do ensaio do MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue). Onde o BPCA e o PTFE não apresentaram respostas tóxicas para as células em cultura, diante dos três ensaios de citotoxicidade utilizados.

O gel de BPCA foi utilizado em um estudo experimental em ratos wistar e um cão por via subcutânea, onde o gel mostrou uma reação inflamatória mínima e sem reação do tipo corpo estranho. Após um ano de aplicação do hidrogel no cão, à análise macroscópica do sítio de implantação durante a necropsia, o gel parecia intacto no local, não sendo observado sinal de degradação do produto (RANGEL et al., 2006).

O gel de BPCA também foi testado no subcutâneo de coelhos, buscando avaliar a reação de sensibilidade local e a biocompatibilidade. Os autores verificaram que houve formação de neovasos em 84,4% na área de implante do gel, intensidade de infiltrado inflamatório estatisticamente significativa e fibrogênese de grau 1 com maior prevalência nos grupos BPCA. Concretizando a biocompatibilidade, a indução tecidual e a integração do BPCA no tecido subcutâneo de coelhos (PITA et al., 2015).

Recentemente, foram estudados por Pinto et al. (2015) os efeitos de citotoxicidade aguda, genotoxicidade e antigenotoxicidade do BPCA, sendo realizados testes *in vitro* e *in vivo* em ratos wistar machos e fêmeas. O estudo mostrou que o biopolímero da cana de açúcar testado não foi citotóxico e nem genotóxico, caracterizando o BPCA como um produto biocompatível e atóxico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Estudar a toxicidade do hidrogel de biopolímero de cana de açúcar a 0,8% em ratos Wistar, por via parenteral (subcutânea e intraperitoneal).

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o potencial toxicológico do hidrogel de BPCA por via SC e IP, a partir dos parâmetros clínicos de toxicidade;
- Analisar a resposta inflamatória e as alterações morfológicas nos sítios de implantação do hidrogel de BPCA;
- Avaliar as alterações morfológicas em órgãos alvos à administração da BPCA por via parenteral.

4 METODOLOGIA

4.1 Biopolímero da Cana de Açúcar à 0,8%

O hidrogel de Biopolímero da Cana de Açúcar (BPCA) à 0,8%, foi produzido pela empresa POLISA-LTDA Polímeros Para Saúde, na Estação Experimental da Cana de Açúcar da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECC/UFRPE), sediada na cidade de Carpina, PE. O hidrogel de BPCA à 0,8% foi adquirido em seringas para aplicação direta e embaladas em papel grau cirúrgico e posteriormente esterilizado através de radiação gama no laboratório de Metrologia do Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

O hidrogel de BPCA à 0,8% foi constituído a partir de uma matriz de exopolissacarídeo produzida por via microbiológica, através da bactéria *Zooglea* sp.

Os principais monossacarídeos presentes na fração solúvel da matriz foram glicose (87,6%), xilose (8,6%), manose (0,8%), ribose (1,7%), galactose (0,1%), arabinose (0,4%) e o ácido glucurônico (0,8%) (PATERSON-BEEDLE et al., 2000).

4.2 Desenho Experimental

4.2.1 Animais

Foram utilizados 48 Ratos *Wistar*, albinos, sendo 24 machos e 24 fêmeas, adultos com 55 dias de vida, provenientes do biotério do CECAL/FIOCRUZ-RJ.

Os animais foram acondicionados em grupos, mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente climatizado ($22 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro/escuro de 12 em 12h e circulação de ar controlada. Receberam ração padrão Labina® e água filtrada durante os 20 dias experimentais. A higienização das caixas de polipropileno foram realizadas a cada 2 dias.

O estudo foi realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, FIOCRUZ. O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ - RJ) e aprovado (Parecer: P-19/14-4).

4.2.2 Protocolo Experimental

Os 48 animais foram divididos em 6 grupos, com 18 animais nos grupos tratados com BPCA 0,8% por via subcutânea, sendo 9 machos e 9 fêmeas e 18 tratados com BPCA 0,8% por via intraperitoneal, sendo 9 machos e 9 fêmeas e 12 animais do grupos controle tratados com Salina a 0,9%, sendo esses 6 machos e 6 fêmeas. O quadro a seguir apresenta os grupos experimentais:

Quadro 1. Desenho Experimental

- | | |
|------|--|
| I. | Grupo tratado com BPCA 0,8% (Via Subcutânea), Machos, (n=9); |
| II. | Grupo tratado com BPCA 0,8% (Via Intraperitoneal), Machos, (n=9); |
| III. | Grupo controle tratado com Salina, (Via Intraperitoneal), Machos, (n=6); |
| IV. | Grupo tratado com BPCA 0,8% (Via Subcutânea), Fêmeas, (n=9); |
| V. | Grupo tratado com BPCA 0,8% (Via Intraperitoneal) Fêmeas, (n=9); |
| VI. | Grupo controle tratado com Salina, (Via Intraperitoneal) Fêmeas, (n=6). |

O hidrogel de BPCA a 0,8% foi administrado em dose única (200mg/Kg de peso), por via subcutânea (SC) ou intraperitoneal (IP), considerando o volume de 4ml/Kg de peso do animal. Após duas horas da administração, os sinais clínicos foram avaliados, sendo reavaliados no final do dia.

Diariamente, do segundo ao 20º dia, os animais foram pesados individualmente, com balança digital e os sinais clínicos observados uma vez por dia.

No ultimo dia experimental, imediatamente após serem pesados e os sinais clínicos avaliados, os animais foram submetidos a anestesia inalatória em câmara de pressão, sobre alta concentração de dióxido de carbono.

O animal foi posicionado em decúbito dorsal, submetido a uma toracotomia, com a exposição do mediastino, para realização da punção cardíaca. Foi coletado 500µl de sangue por animal para análises bioquímicas, utilizando agulha de 25x7 mm.

Em seguida, os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical. Foi conduzida a necropsia com laparotomia para remoção do fígado, baço, rins de todos os grupos e do fragmento de pele do grupo tratado com BPCA 0,8% por via subcutânea.

Todas as amostras foram pesadas e fixadas em formalina tamponada à 10% para análise histológica.

4.3 Avaliação da toxicidade por via parenteral

Para a determinação da toxicidade a substância, BPCA a 0,8%, foi administrada em dose única por via parenteral, SC ou IP, considerando a relevância desta rota humana de exposição ao produto, com o objetivo de avaliar aspectos como a absorção, o processo de degradação e eliminação do hidrogel pelo organismo, modificações teciduais na área da administração, além de aspectos gerais relacionados ao metabolismo e à cinética do produto.

A avaliação toxicológica da administração da BPCA por via parenteral, especialmente pelas vias SC e IP, justifica-se por ser a matriz de BPCA promissora ao sistema de liberação de fármacos. Além disto, vislumbra-se o uso do hidrogel como agente de preenchimento.

4.4 Sinais Clínicos de Toxicidade

Os animais foram avaliados diariamente através de parâmetros de avaliações clínicas. O peso corporal era descrito em uma planilha com o intuito de obter-se possíveis alterações no peso devido a aplicação do BPCA.

Em outra planilha, eram descritos os comportamentos dos animais. Sobre a bancada eram individualmente observados se apresentavam hipoatividade ou hiperatividade com ou sem laterização, além da piloereção, vocalização, cromodacrorréia, epitaxis, lacrimejamento ou queda de pelos que poderiam ser provocados pela administração da substância.

4.5 Processamento Histológico

Para realização da análise histológica, as amostras utilizadas foram retiradas após a eutanásia e armazenados em formol tamponado a 10%.

Após o período mínimo de 48hs as amostras seguiram para o processamento conforme rotina histológica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE. Sendo incluído em parafina, cortadas no micrótomo em 4µm de espessura, dispostas em lâminas foscas e levado a estufa por 24h, em temperatura de 40°C. Passado esse tempo os tecidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE), sendo avaliados em microscópio óptico por um patologista.

4.6 Análise Histológica

Para análise histológica do fígado, baço e rins foram considerados os aspectos morfológicos observados na coloração de hematoxilina e eosina (HE), comparando os grupos tratados com o gel de BPCA com o grupo salina. Os parâmetros foram os mesmos utilizados por Feitosa et al. (2005), Cintra (2010) e Araújo (2014), em uma análise semi-quantitativa, avaliando o aparecimento ou não de lesões teciduais.

Nos rins foi avaliado se houve vacuolização citoplasmática, simplificação do epitélio tubular, obstrução da luz dos túbulos, inflamação e hipertrofia do glomérulo.

No fígado foi avaliado a vacuolização dos hepatócitos, formação de fibrose, congestão nos vasos e inflamação.

No baço foi avaliado se houve infarto por obstrução dos vasos devido a aplicação BPCA e alterações na poupa branca e vermelha.

A análise histopatológica do fígado, rins e baço foi realizada no Laboratório de Microscopia do Centro Acadêmico de Vitória, UFPE.

Na análise histológica do gel de BPCA aplicado no subcutâneo, foram avaliados os aspectos relacionados à localização e homogeneidade do implante de BPCA, a presença de fibroblastos, células inflamatórias, células gigantes multinucleadas (CGMN) e a formação de neovasos, através da análise semi-quantitativa, sendo as lâminas classificadas em quatro graus: G0, Ausente (0-5%), GI, Leve (5-25%), GII, Moderado (25-50%) e GIII, Intenso (Mais de 50%), com base no percentual sobre o qual as células e vasos se formaram no implante de BPCA (CAVALCANTE, 2015).

A análise histológica do gel de BPCA no subcutâneo foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE.

4.7 Análise Estatística

Todos os dados foram avaliados pelo programa GraphPad Prism® versão 3.0. As frequências foram representadas em porcentagem e analisadas pelo teste exato de Fisher. Os dados contínuos foram apresentados como média e desvio padrão, estudados por teste paramétrico ou não-paramétrico, de acordo com o nível de normalidade. O nível nominal de 0,05 foi escolhido para rejeitar a hipótese nula (significância estatística).

5 RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir referem-se aos sinais clínicos de toxicidade, incluindo a avaliação do peso diário, do ganho de peso e dos parâmetros de toxicidade (sinais flogísticos no local da administração do BPCA, bem como sinais sistêmicos, como piloereção, cromodacriorréia, epistaxis, hipo/hiperatividade e outras alterações do comportamento animal), avaliação macroscópica no sítio de implantação do BPCA, no momento da necropsia e avaliação macroscópica, incluindo a análise histopatológica (fígado, rim e baço) e histológica da área de implante do BPCA por via subcutânea.

5.1 Sinais Clínicos de Toxicidade

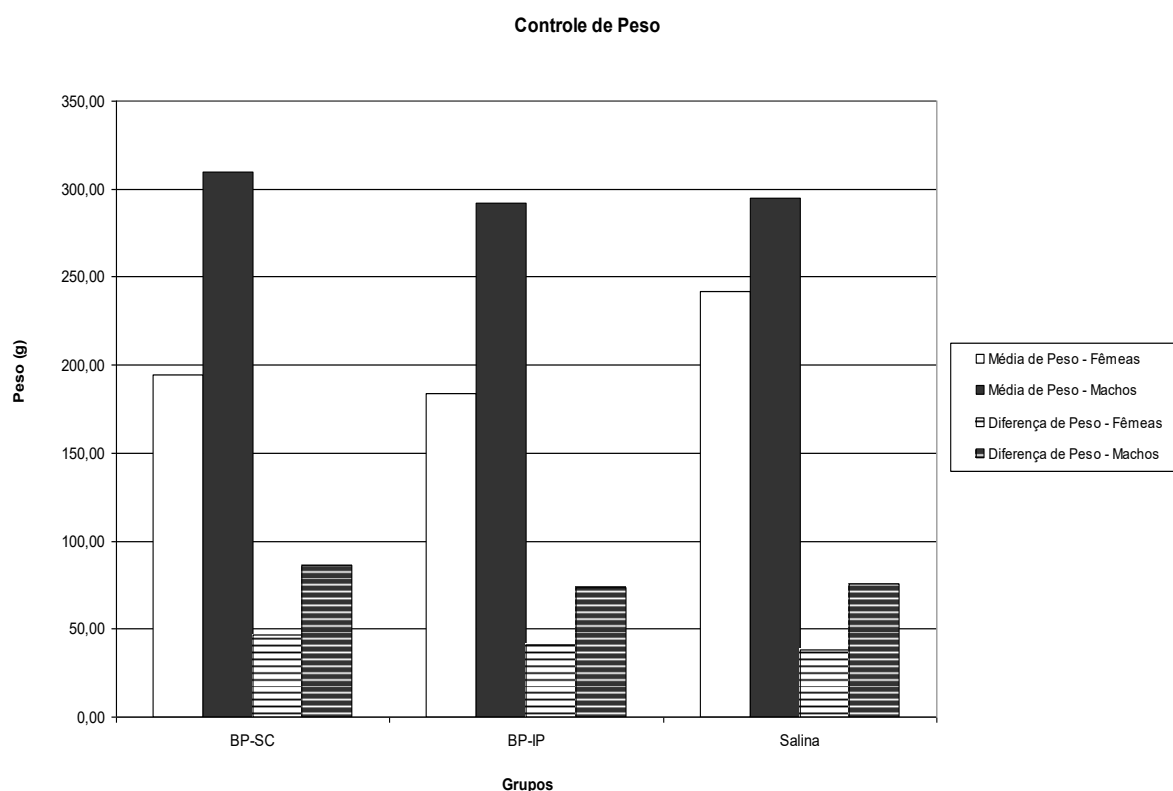
Todos os animais apresentaram comportamento normal durante o experimento, não havendo diferenças significativas no peso corpóreo entre os grupos. Não foram observados sinais clínicos de toxicidade.

O peso médio dos animais foi semelhante entre machos ($p=0,1466$) e fêmeas ($p=0,2821$), em todos os grupos. A diferença de ganho de peso mostrou-se equivalente entre as fêmeas ($p=0,1147$), porém para os machos observou-se maior ganho de peso no grupo que recebeu o BPCA por via subcutânea, mas sem diferença significativa ($p=0,0516$). A Tabela 1 apresenta todos os dados de peso. A Figura 1 ilustra estes dados.

Tabela 1. Média de peso dos animais ao final do experimento e ganho de peso, por grupo.

Grupos	Média de Peso ¹		Ganho de Peso D20-D1 ²	
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos
BPCA-SC	194,77 ± 16,03	310,03 ± 24,26	46,86 ± 7,42	86,57 ± 10,49
BPCA-IP	183,80 ± 14,22	292,35 ± 18,27	40,84 ± 6,92	73,79 ± 8,60
Salina	241,80 ± 11,69	294,69 ± 21,61	38,43 ± 8,72	75,75 ± 8,86
Valor de <i>p</i>	0,1466	0,2821	0,1147	0,0516

Os valores estão representados como média ± Desvio padrão (DP). O ganho de peso foi mensurado pela subtração entre o peso final (D20) e o peso inicial (D1). ¹Análise da média de peso pela ANOVA seguida do teste *t* de student. ²Análise do ganho de peso pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney. *Estatisticamente significativo se $p < 0,05$, sendo a: BPCA-SC ≠ BPCA-IP; b: BPCA-SC ≠ Salina; c: BPCA-IP ≠ Salina.

**Figura 1** – Ganho de peso dos animais por grupo. FONTE: Elaborado pelo autor.

Houve diferença estatística no peso relativo do fígado das fêmeas, entre o grupo tratado com BPCA por via subcutânea e o controle ($p=0,0064$) e no peso relativo do rim direito de machos, entre o grupo tratado com BPCA por via intraperitoneal e o controle ($p=0,0458$). Para os demais não foram observadas diferenças significativas, como pode ser visto nas Tabelas 2 e 3.

A figura 2 ilustra o peso médio dos órgãos entre machos e fêmeas, nos diferentes grupos.

Tabela 2. Pesos relativos dos órgão de fêmeas, por grupo.

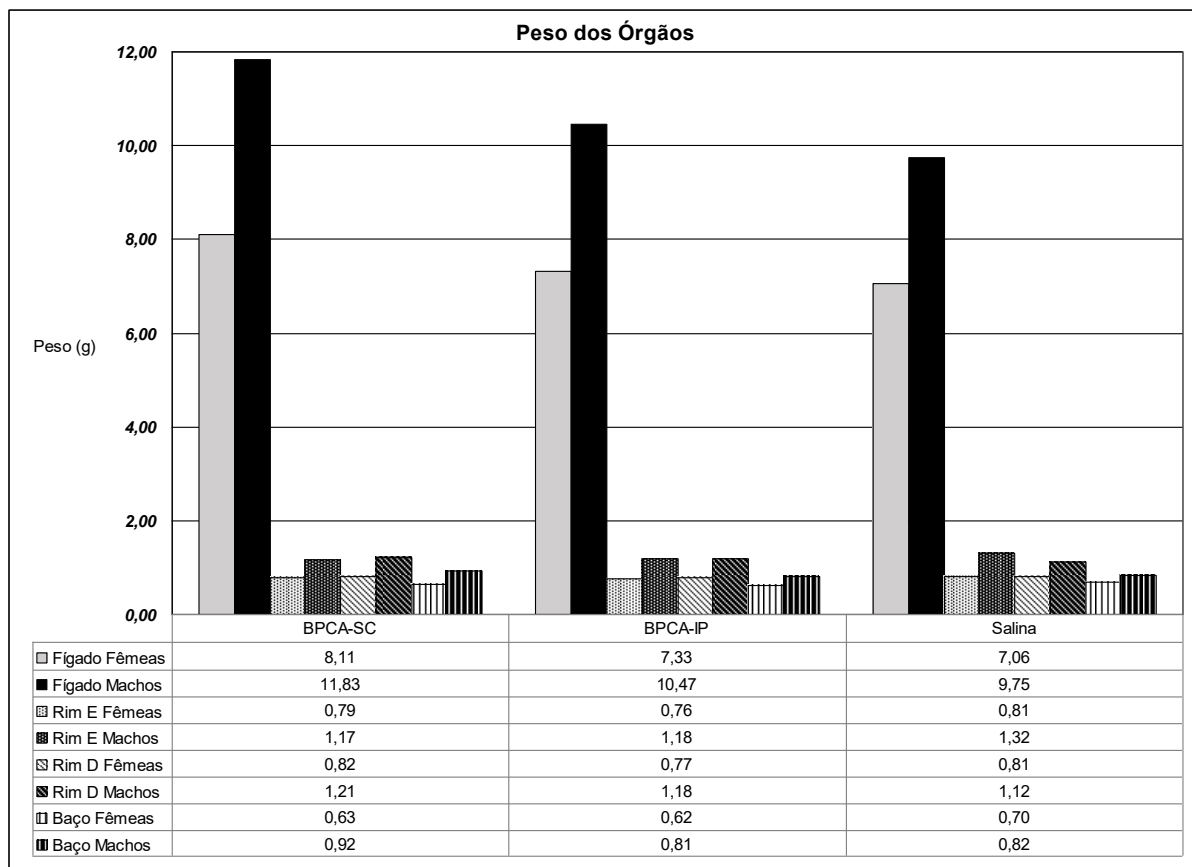
Grupos	Peso relativo dos Órgãos			
	Fêmeas			
	Fígado	Rim Direito	Rim Esquerdo	Baço
BPCA-SC	$3,67 \pm 0,23^b$	$0,37 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,03$
BPCA-IP	$3,53 \pm 0,33$	$0,37 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,05$
Salina	$2,96 \pm 1,01$	$0,33 \pm 0,12$	$0,34 \pm 0,12$	$0,29 \pm 0,09$
Valor de p^1	0,0064*	0,9631	0,4430	0,2001

Os valores estão representados como média $\pm$ Desvio padrão (DP). O peso relativo foi calculado com base no peso final do animal (D20). ¹Análise pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. *Estatisticamente significativo se $p < 0,05$, sendo a: BPCA-SC $\neq$ BPCA-IP; b: BPCA-SC $\neq$ Salina; c: BPCA-IP $\neq$ Salina.

Tabela 3. Pesos relativos dos órgão de machos, por grupo.

Grupos	Peso relativo dos Órgãos			
	Machos			
	Fígado	Rim Direito	Rim Esquerdo	Baço
BPCA-SC	3,35 ± 0,19	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,26 ± 0,04
BPCA-IP	3,16 ± 0,36	0,36 ± 0,01 ^c	0,36 ± 0,02	0,24 ± 0,04
Salina	2,68 ± 0,98	0,30 ± 0,11	0,35 ± 0,16	0,22 ± 0,07
Valor de p^1	0,1158	0,0458*	0,0685	0,6961

Os valos estão representados como média ± Desvio padrão (DP). O peso relativo foi calculado com base no peso final do animal (D20). ¹Análise pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn para múltiplas comparações. *Estatisticamente significativo se $p < 0,05$, sendo a: BPCA-SC ≠ BPCA-IP; b: BPCA-SC ≠ Salina; c: BPCA-IP ≠ Salina.

**Figura 2** – Peso médio dos órgãos dos animais por grupo. FONTE: Elaborado pelo autor.

5.2 Análises Macroscópicas

No momento da retirada das peças anatômicas, foram observadas as seguintes alterações, no grupo que recebeu BPCA por via intraperitoneal: Nas fêmeas, foi observado resquício de BPCA na cavidade em dois animais e aderência do BPCA ao músculo em um animal. Nos machos, percebeu-se a presença de um cisto na parede do peritônio em um animal, um cisto sobre o rim esquerdo em um animal e aderência do BPCA em um animal. Não foram observadas alterações macroscópicas no controle e no grupo BPCA quando administrado por via subcutânea.

5.3 Análises Microscópicas

5.3.1 Análise Histopatológica no Fígado, nos Rins e no Baço

Foram realizadas análises histopatológicas semi-quantitativas, ao microscópio óptico, por profissional habilitado, às cegas.

Foram detectadas alterações no fígado e no rim de animais que receberam o BPCA e, eventualmente, no controle. A tabela 4 apresenta as principais alterações encontradas.

Alterações histopatológicas	BPCA				Controle (Salina)			
	Fígado		Rim		Fígado		Rim	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
Infiltrados inflamatórios	1 SC 1 IP	4 SC	-	-	1 IP	1 IP	1 IP	-
Vacuolização	-	1 SC	-	-	-	-	-	-
Congestão dos vasos	-	1 SC 1 IP	-	-	-	1 IP	-	-
Hipertrofia do corpúsculo	-	-	8 IP	-	-	-	-	-
Cálculo renal	-	-	-	4SC 2 IP	-	-	-	-

Os dados apresentados são valores absolutos de alterações encontradas nos animais submetidos à via IP, Intraperitoneal ou SC, Subcutânea.

Não foram encontradas alterações histopatológicas no baço.

A seguir serão apresentados os resultados detalhados da avaliação histopatológica por órgão analisado e também a histologia da área de implante subcutâneo do BPCA.

5.3.2 Fígado

Não foi observada a presença de fibrose ou calcificação em nenhum dos grupos. Foi detectada a congestão vascular como mostram as Figuras 3A e 3B, vacuolização dos hepatócitos (Figura 4A) e inflamações severas características de intoxicação em três animais tratados com BPCA por via intraperitoneal (Figura 5). A Figura 4B ilustra os hepatócitos sem anormalidades.

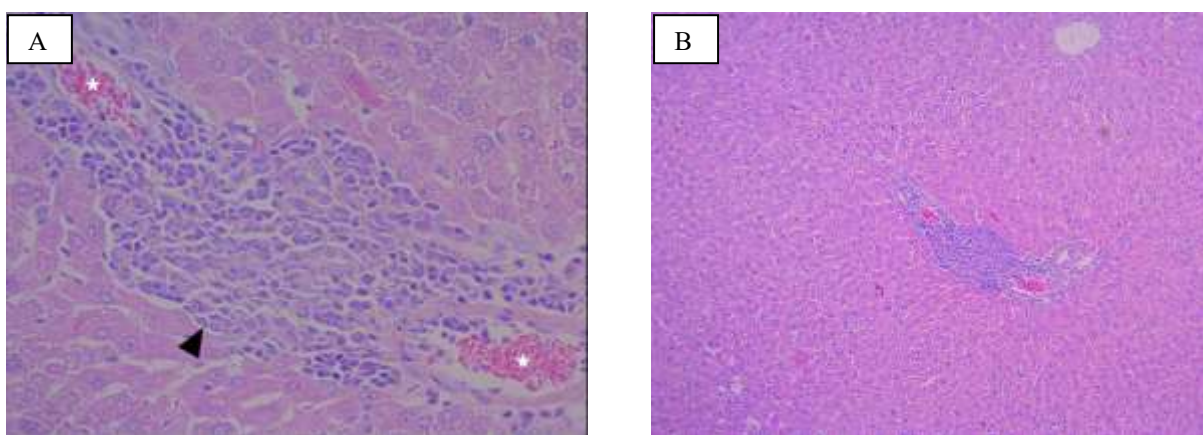


Figura 3. Infiltrado inflamatório perivascular (cabeça de seta) e congestão nos vasos (estrela) no grupo BPCA machos intraperitoneal. HE. **A)** 400x. **B)** 100x.

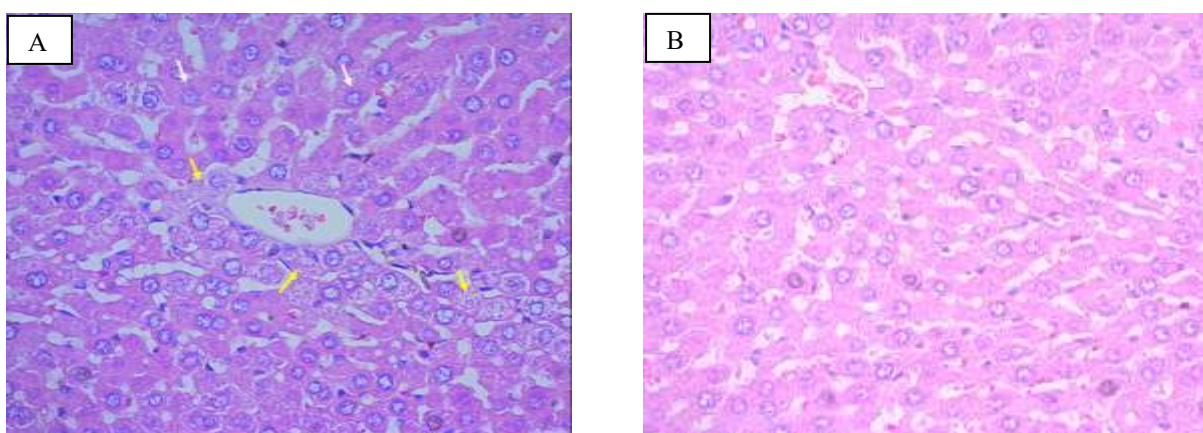


Figura 4. **A)** Comparação dos hepatócitos normais (seta branca) com hepatócitos apresentando vacuolização (seta amarela) nas fêmeas do grupo tratado com BPCA por via intraperitoneal. **B)** Fêmeas do grupo tratado com BPCA por via intraperitoneal apresentando normalidade nos hepatócito. HE. 400x.

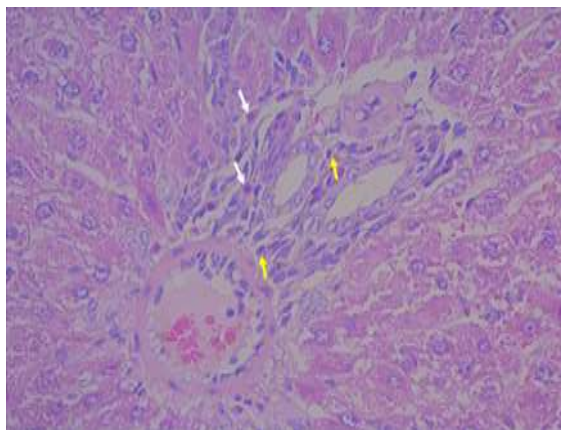


Figura 5. Infiltrado inflamatório característico de resposta crônica (seta branca) e aguda (seta amarela) periductal e perivascular, em fêmeas do grupo BPCA administrado por via subcutânea. HE. 400x.

5.3.3 Rim

Não foram observadas alterações no epitélio renal e nem presença de fibrose. A maioria (88,89%) dos animais machos tratados com BPCA por via intraperitoneal apresentou corpúsculo renal maior em comparação ao grupo controle (Figuras 6 e 7). Em 6 (33,33%) animais tratados com BPCA, 2 (22,22%) do grupo intraperitoneal e 4 (44,44%) do subcutâneo, foram encontradas alterações indicativas da formação de cálculos renais (Figura 8).

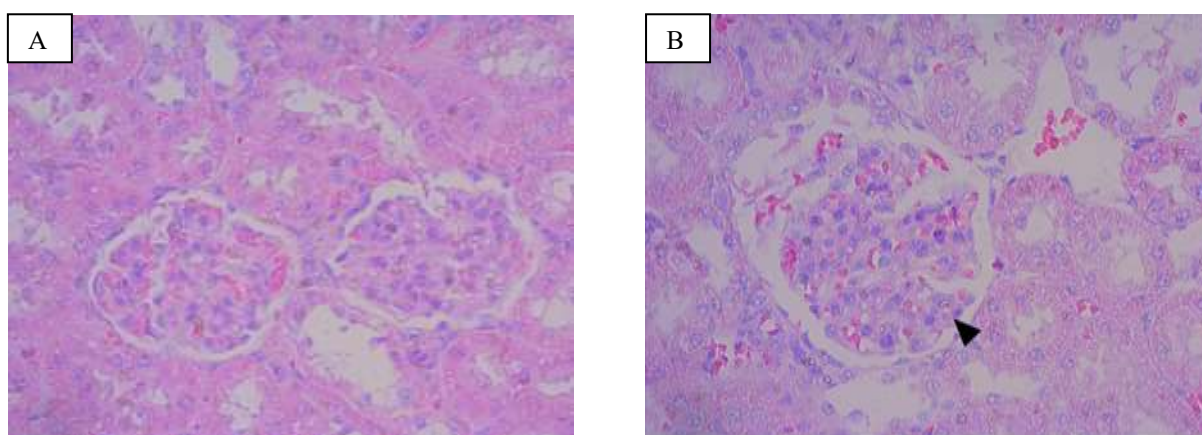


Figura 6. Diferença de tamanho entre corpúsculo renal no grupo BPCA subcutâneo (A) e aumento do corpúsculo (B) no grupo BPCA intraperitoneal. HE. 400x.

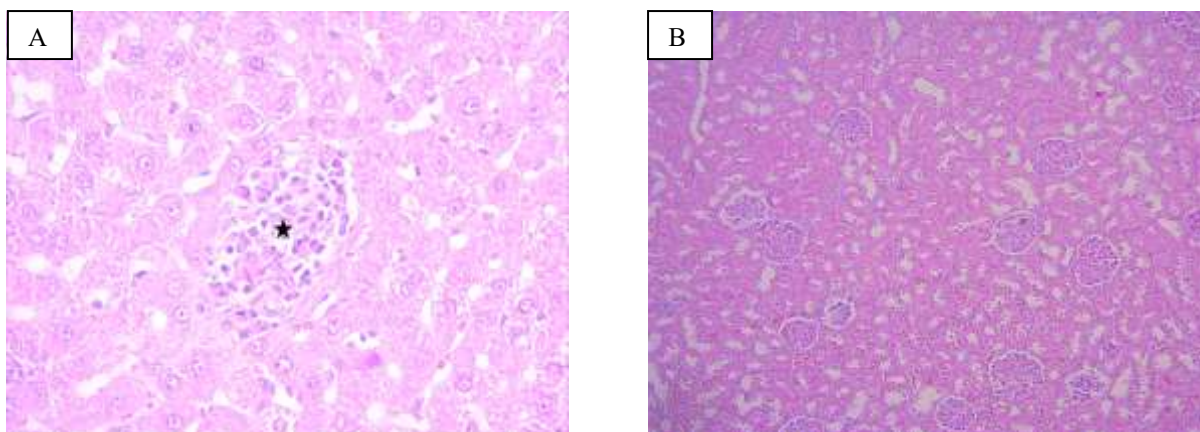


Figura 7. Corpúsculo renal com inflamação (estrela) no grupo salina de fêmeas **(A)**, comparando com corpúsculos saudáveis no grupo BPCA subcutâneo **(B)**. HE. 400x e 100x respectivamente.

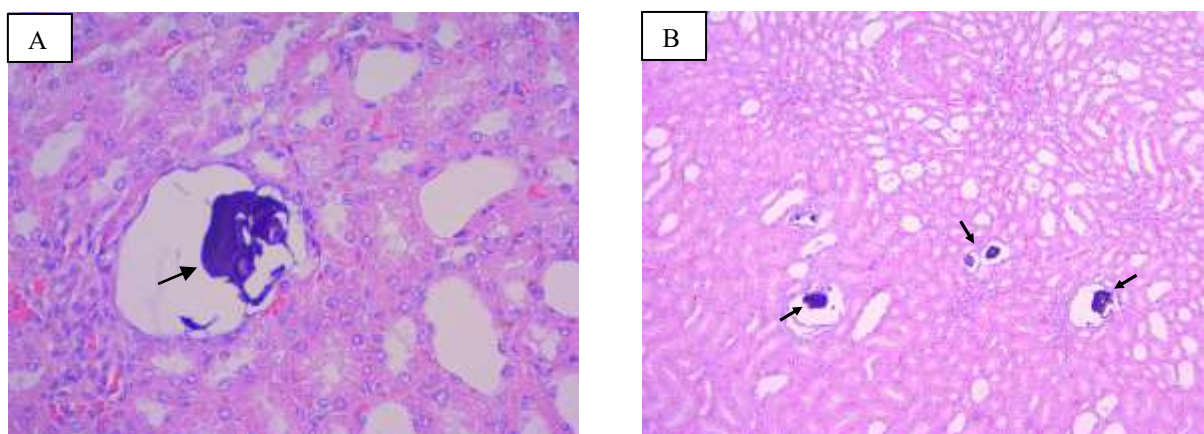


Figura 8. Presença de cálculo no epitélio renal (setas pretas) em fêmeas do grupo BPCA administrado por via subcutânea. HE. **A)** 400x e **B)** 100x.

5.3.4 Baço

Não foram identificadas áreas com presença de inflamação e nem alterações significativas na polpa branca e vermelha do baço.

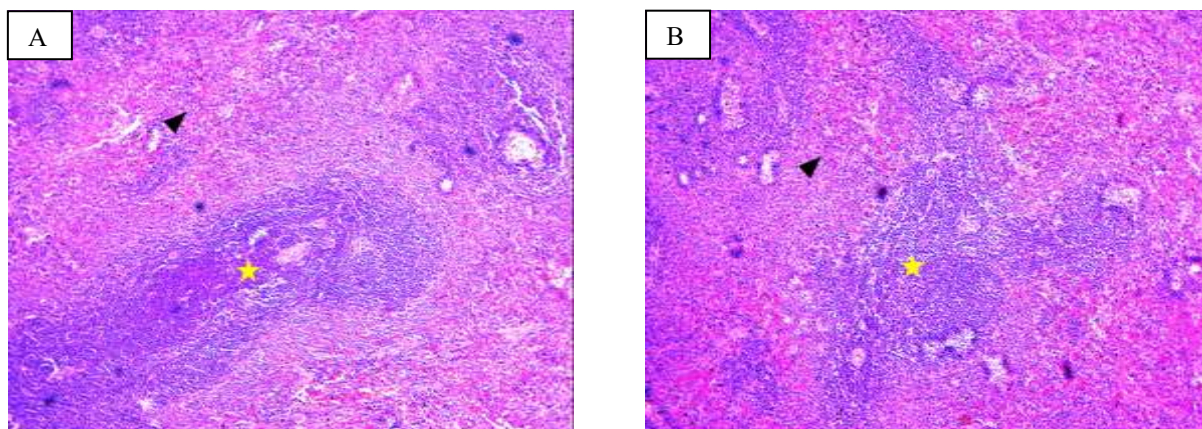


Figura 9. **A)** Baço do grupo BPCA intraperitoneal evidenciando normalidade nas poupas branca (estrela) e poupa vermelha (cabeça de seta). **B)** Poupa branca (estrela) e poupa vermelha (seta) do grupo BPCA subcutânea sem apresentar alterações. HE, 100x.

5.3.5 *Análise Histológica do gel de BPCA no Subcutâneo*

A maioria (88,89%) dos implantes de BPCA estava presente abaixo do tecido muscular, próximo a hipoderme, ou seja, inserido no subcutâneo. Apenas em dois animais, um macho e uma fêmea, não foi possível detectar o implante de BPCA, inviabilizando a análise destas amostras.

O implante de BPCA estava homogêneo na maioria das amostras, representando 77,78% nos machos e 88,89% nas fêmeas.

CGMN ausentes na maioria dos machos (75%) e de intensidade leve nas fêmeas (50%). A intensidade de formação de neovasos na área do implante de BPCA variou de ausente a intenso equitativamente, tanto em machos como nas fêmeas. A resposta inflamatória na área do implante foi semelhante em machos e fêmeas, correspondendo a intensidade leve (100%). A presença de fibroblastos variou entre ausente (machos, 62,5%) e leve (fêmeas, 87,5%).

A Tabela 5 resume os achados da análise morfológica na área de implante do BPCA. As Figuras 10A, 10B e 10C ilustram esta análise morfológica.

Tabela 5. Análise Morfológica na Área de Implante do BPCA.

Variáveis	BPCA-SC		Valor de p^2
	Machos	Fêmeas	
Localização do Implante			
Presente	08 (88,89%)	08 (88,89%)	1,0000
Ausente	01 (11,11%)	01 (11,11%)	
Homogeneidade do Implante			0,9500
Homogênea	07 (77,78%)	08 (88,89%)	
Fragmentada	01 (11,11%)	0 (0%)	
Ausente	01 (11,11%)	01 (11,11%)	
CGMN¹			0,3147
Ausente (0-5%)	06 (75,0%)	03 (37,5%)	
Leve (5-25%)	02 (25,0%)	04 (50,0%)	
Moderada (25-50%)	0	01 (12,5%)	
Intensa (Mais de 50%)	0	0	
Neovasos¹			0,5692
Ausente (0-5%)	03 (37,5%)	01 (12,5%)	
Leve (5-25%)	0	02 (25,0%)	
Moderada (25-50%)	03 (37,5%)	02 (25,0%)	
Intensa (Mais de 50%)	02 (25,0%)	03 (37,5%)	
Resposta Inflamatória¹			NA
Ausente (0-5%)	0	0	
Leve (5-25%)	8 (100%)	8 (100%)	
Moderada (25-50%)	0	0	
Intensa (Mais de 50%)	0	0	
Presença de Fibroblastos¹			0,1189
Ausente (0-5%)	05 (62,5%)	01 (12,5%)	
Leve (5-25%)	03 (37,5%)	07 (87,5%)	
Moderada (25-50%)	0	0	
Intensa (Mais de 50%)	0	0	

¹Foram avaliadas 8 lâminas, pois em um animal de cada grupo o implante de BPCA não foi detectado. ²Análise pelo teste Exato de Fisher. *Estatisticamente significativo se $p < 0,05$. NA, não se aplica.

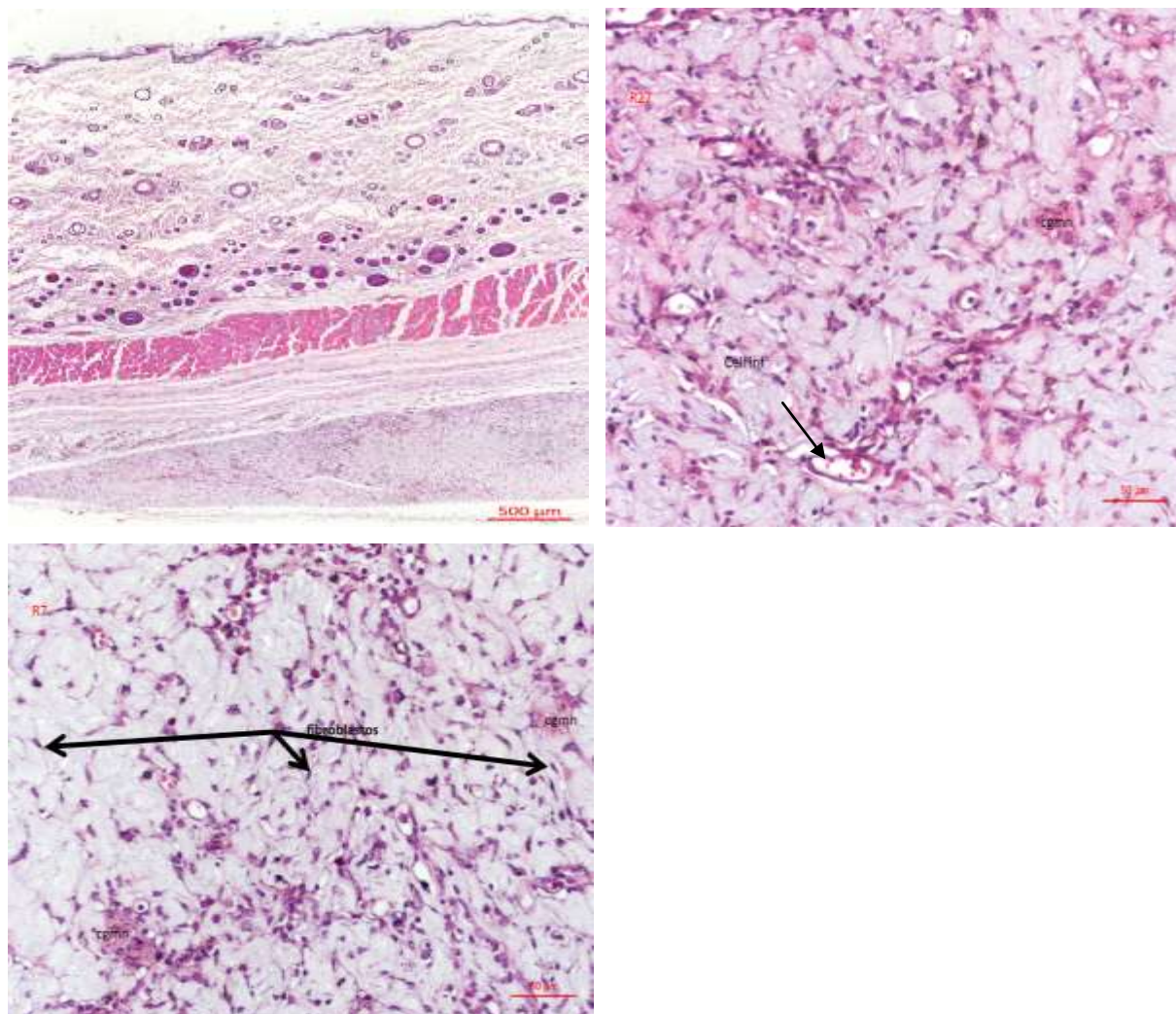


Figura 10. A) Localização do implante de BPCA no subcutâneo (cabeça de seta). B) Presença de neovasos no implante de BPCA-SC (seta) e de células gigantes (CGMN). C) Presença abundante de fibroblastos, células gigantes (CGMN) e neovasos (setas). HE, A e B, 50x e C, 200x.

6 DISCUSSÃO

O peso médio dos animais foi semelhante em todos os grupos. O ganho de peso em todos os animais foi positivo, independente do grupo, porém sem diferença significativa. Dados semelhantes foram encontrados por Pita et al. (2015) e Lucena et al. (2015).

Em relação ao peso relativo, o fígado das fêmeas tratadas por via subcutânea apresentou diferença estatística em comparação ao grupo controle ($p=0,0064$), o que pode ser justificado pelas diferenças histopatológicas encontradas nesse grupo, onde o mesmo apresentou alterações indicativas de inflamação hepática.

Houve diferença significativa no peso relativo do rim direito dos machos tratados por BPCA por via intraperitoneal em relação ao controle ($p=0,0458$). Tal aspecto pode estar relacionado a eliminação do BPCA, inclusive, por ter sido observada a hipertrofia dos corpúsculos nesse grupo. Contudo, na literatura são escassos os dados relacionados a este aspecto.

Foram encontrados cistos sobre os rins de animais tratados por via intraperitoneal, porém estes achados foram inconsistentes e, por isso, não foi possível estabelecer relação causal entre estas alterações macroscópicas e os achados histopatológicos (cálculo renal e hipertrofia dos corpúsculos renais)

Sobre o cálculo renal, encontrado apenas nas fêmeas, novos estudos com outras colorações necessitam ser feitas para a concretização deste achado. No entanto, especula-se que isto possa ter ocorrido devido a interferência endócrina. Neste sentido, outras estruturas como as glândulas tireóide, adrenais e gônadas, além de alguns biofluidos (sangue e urina) precisam ser estudados para elucidação desta hipótese.

Alguns autores encontraram alterações de cor, incrustação e cálculos implantando materiais sintéticos em bexigas de ratos (FORD et al., 1985; CARVALHO JÚNIOR et al., 2012). Um estudo com implantação de BPCA na forma de túbulo, na bexiga de ratos, mostrou resultados semelhantes, inclusive com a formação de cálculo (LIMA, 2014). Porém, não há relatos na literatura de achados relativos a formação de cálculo renal pelo uso do BPCA.

Não foram identificadas áreas com presença de inflamação e nem alterações significativas na polpa branca e vermelha do baço. Porém serão feitas medições na poupa branca para verificar se houve um aumento desta nos diferentes grupos, seguidas de análises de histomorfometria para averiguar o potencial da substância sobre o baço (PINTO, 2012).

O implante de BPCA estava homogêneo na maioria das amostras, representando 77,78% nos machos e 88,89% nas fêmeas. CGMN ausentes na maioria dos machos (75%) e de intensidade leve nas fêmeas (50%). A intensidade de formação de neovasos na área do implante de BPCA variou de ausente a intenso equitativamente, tanto em machos como nas fêmeas. A resposta inflamatória na área do implante foi semelhante em machos e fêmeas, correspondendo a intensidade leve (100%). A presença de fibroblastos variou entre ausente (machos, 62,5%) e leve (fêmeas, 87,5%). Estes achados corroboram com os encontrados por Cavalcante (2015), Silveira et al. (2014), Lima et al. (2015), Lucena et al. (2015), Rangel et al. (2006) e Pita et al. (2015).

A via subcutânea pode ser considerada uma via importante para administração de medicamentos e, especialmente, pode ser usada para deposição/implante de fármacos de liberação controlada. É uma via de fácil acesso e boa absorção, principalmente por não sofrer o efeito de primeira passagem, característico da via oral. Sendo assim, é recomendável avaliar a toxicidade do hidrogel de BPCA por esta via. Assim como na presente pesquisa, os estudos anteriores não revelaram sinais de toxicidade clínica ou reação inflamatória significativa na área de administração do BPCA (PITA et al., 2015; LUCENA et al., 2015).

Por outro lado, a via intraperitoneal, devido à dificuldade de manejo para administração de medicamentos, não é muito utilizada. No entanto, por ser representativa quanto a área de absorção e sua capacidade absorviva, ela também foi escolhida neste trabalho. Lima et al. (2005) ao avaliar a resposta inflamatória da membrana de BPCA comparada as telas de polipropileno® quando implantadas no peritônio parietal de ratos, evidenciaram que não houve inflamação e houve incorporação do material ao peritônio.

O BPCA não foi tóxico por via oral, quando administrado em dose única (PINTO et al., 2015). Pela via tópica o BPCA também não apresentou reações adversas (MARTINS et al., 2013).

Em estudos anteriores (CASTRO et al., 2004; PINTO et al., 2015) não foi evidenciada toxicidade relativa ao BPCA e, apesar desta pesquisa ter apontado indícios leves de toxicidade, os resultados apresentados são preliminares, o que limita a discussão e a conclusão deste estudo.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o hidrogel de biopolímero de cana de açúcar a 0,8% apresentou leves indícios de toxicidade quando administrados em ratos Wistar, por via parenteral (subcutânea e intraperitoneal).

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Percebe-se a necessidade de ajustes metodológicos para confirmação dos resultados encontrados, por exemplo, substituindo a técnica de análise histológica semi-quantitativa por uma histomorfométrica e também pela necessidade de realização de testes bioquímicos em amostras de sangue (Aminotransferase de Aspartato, AST e Aminotransferase de alanina, ALT), que apesar de coletadas ainda não foram processadas. Seria importante ainda a análise da função renal pela dosagem da depuração da uréia e da creatinina.

Trata-se, contudo, de um estudo com resultados preliminares e espera-se futuramente realizar outros testes, como o de toxicidade subcrônica, para confirmar os desfechos histopatológicos encontrados.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P. C. V. C.; AGUIAR, J. L. A. et al. Comparative study of the areas of osteochondral defects produced in the femoral condyles of rabbits treated with gel of sugarcane biopolymer. **Acta Cirúrgica Brasileira (online)**, São Paulo, v. 26, n. 5, p.383-386, 2011.
- ANDRADE, C.E.M.C.; AGUIAR, J.L.A. Biopolímero da Cana-de-Açúcar: estudo de biocompatibilidade. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIÊNTÍFICA DA UFPE, 10.,2002. Recife. **Anais....** Recife: Ed. Universitária UFPE, 2002. P. 191-191.
- ARAUJO, I. B. B. A. **Análise imuno-histoquímica de hipóxia renal em modelo de isquemia/reperfusão tratado com fator estimulador de colônia de granulócitos**. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2015.
- CARVALHO JUNIOR, A, M.; BARKOKÉBAS, B. B.; AGUIAR, J. L. A.; LIMA, S. V. C.; DAMBROS, M. Characterization of the deposition of collagen fibers and Lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. **International Braz J Urol (Impresso)** v. 38, p. 544-551, 2012.
- CASTRO, C.M.M.B.; AGUIAR, J.L.A.; MELO, F.A.D.; SILVA, W.T.F.; MARQUES, E.; SILVA, D.B. Citotoxicidade de Biopolímero de Cana-de-Açúcar. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, v. 49, n.2, p.119-123, dez., 2004.
- CAVALCANTE, A. R. T. **Preenchimento da submucosa do anorreto com biopolímero de cana de açúcar para o tratamento da incontinência fecal após trauma do esfíncter anal em ratos**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2015.
- CINTRA, L. **Estudo clínico, laboratorial e anatomopatológico dos órgãos linfohematopoiéticos na síndrome de emagrecimento progressivo dos calitriquídeos mantidos em cativeiro**. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e comparada) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.
- COELHO, M. C. O. C et al. Biopolímero Produzido a partir da Cana-de-Açúcar para Cicatrização Cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**. São Paulo, V 17, Supl 1, 2002.
- CORDEIRO-BARBOSA, F.A.; AGUIAR, J. L. A.; LIRA, M. M. M.; PONTES FILHO, N.T.; BERNADINO-ARAÚJO, S. Use of a gel biopolymer for the treatment of eviscerated eyes: experimental model in rabbits. **Arq. Bras. Oftalmol.** v. 75, n. 4, p. 267-272, 2012.
- DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, São Paulo, V. 35, N. 4, 2010.
- FEITOSA, E. A. M. et al. Estudo da morfologia renal após a oclusão da aorta abdominal infra-renal em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** V. 32, p. 178-182, 2005.

FORD, T. F.; PARKINSON, M. C.; FYDELOR, P. J.; RINGROSE, B. J.; WICKHAM J. E. A preliminary in vivo assessment of acrylic acid graft-copolymers in the urinary tract. **J Urol.** v. 133, n. 1, p.141-143, 1985.

GUASTALDI, A. C. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomaterias, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, São Paulo, V. 33, n. 6, 2010.

LIMA, F. R.; LIMA, J.R.A.; HIRAKAVA, P.; MEDEIROS JR, M.D.; LIMA, F.M.T.; AGUIAR, J.L.A.; Resposta inflamatória a biomembranas de polímero de cana-de-açúcar e telas de polipropileno® implantadas no peritônio parietal de ratos. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**. Recife, v.50, n1, p.37-39, 2005.

LIMA, S.L. **Biopolímero de cana-de-açúcar como prótese endourológica em ratos wistar**. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

LIMA, S. V. C.; RANGEL, A. E. O.; LIRA, M. M. M.; PINTO, F.C.M.; CAMPOS JUNIOR, O.; SAMPAIO, F. J. B.; AGUIAR, J. L. A. The Biocompatibility of a Cellulose Exopolysaccharide Implant in the Rabbit Bladder When Compared With Dextranomer Microspheres Plus Hyaluronic Acid. **Urology**. v. 85, p.1520-1526, 2015.

LUCENA, R. G.; VILAR, F. O.; ANDRADE, R. T.; PINTO, F. C. M.; LIMA, S. V. C.; Experimental use of a cellulosic biopolymer as a new material for suburethral sling in the treatment of stress urinary incontinence. **International Braz J Urol (Online)**. v. 41, p. 1148-1153, 2015.

LUCENA, M. T. et al. Biocompatibility and cutaneous reactivity of cellulosic polysaccharide film in induced skin wounds in rats. **Materials in Medicine (Dordrecht. Online)**. v. 26, p. 5410, 2015.

MARQUES, S. R. B.; LINS, E. M.; AGUIAR, J. L. A.; ALBUQUERQUE, M. C. S.; ROSITER, R. O.; MONTENEGRO, L.T.; MELO, R. J. V. Um novo substituto vascular: Arterioplastia femoral em cães como remendo de membrana de biopolímero de cana-de-açúcar – Avaliação hemodinâmica e histopatológica. **Jornal Vascular Brasileiro (online)**. V. 6, p. 309-315, 2007.

MARTINS, A. G. S.; LIMA, S. V. C.; ARAUJO, L. A. P.; VILAR, F. O.; CAVALCANTE, N.T.P.A.; Wet dressing for hypospadias surgery. **Int Braz J Urol**. V. 39, n. 3, p.408-413, 2013.

Norma ABNT NBR 15448-1. Embalagens plásticas degradáveis e/ou de fontes renováveis Parte 1: Terminologia.

OKIYAMA, A. et al. Bacterial cellulose II. Processing of the gelatinous cellulose for food materials. **Food Hydrocolloids**. 6: 479-487, 1992.

OKIYAMA, A., KANO, H. et al. Bacterial cellulose I. Two-stage fermentation process for cellulose production by *Acetobacter aceti*. **Food Hydrocolloids**. 6: 471-477, 1992.

PATERSON-BEEDLE M, KENNEDY JF, MELO FAD, LLOYD LL, MEDEIROS V. A cellulosic exopolysaccharide produced from sugarcane molasses by a *Zoogloea sp.* **Carbohydrate Polymers**. 2000; 42(4):375–383.

PINTO, F. C. M.; OLIVEIRA, A. C. A. X.; CARVALHO, R. R.; CARNEIRO, M. R. G.; COELHO, D. R.; LIMA, S. V. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; AGUIAR, J. L. A.; Acute toxicity, cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxic effects of a cellulosic exopolysaccharide obtained from sugarcane molasses. **Carbohydrate Polymers**. v. 137, p. 556-560, 2016.

PINTO, I. A. A.; **avaliação do potencial carcinogênico do dibenzotiofeno e dibenzotiofeno sulfona em ratos wistar**. (Dissertação – Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.

PITA, P. C. C.; PINTO, F. C. M.; LIRA, M. M. M.; MELO, F. A. D.; FERREIRA, L. M.; AGUIAR, J. L. A. Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira (Online)**. v. 30, p. 296-300, 2015.

RANGEL, A. E. O.; AGUIAR, J. L. A.; LIMA, S. V. C.; VILAR F. A new biomaterial for the Treatment of Vesicoureteral Reflux: Experimental Study. **International Brazilian Journal of Urology**. v. 32. p. 184, 2006.

SILVEIRA, A. F. N.; AGUIAR, J. L. A.; CAMPOS JUNIOR, O.; DINIZ, G. T.; LIMA, S. V. C.; Membrana de biopolímero de cana-de-açúcar: Uma realidade como opção para correção da incontinência urinária. **Millenium (Viseu)**, v. 1, p. 81-95, 2014.

SILVEIRA, F. C. A.; PINTO, F. C. M., CALDAS NETO, S. S.; LEAL, M. C.; CESÁRIO, J.; ANDRADE, J. L. A.; Treatment of tympanic membrane perforation using bacterial cellulose: a randomized controlled trial. **Braz J Otorhinolaryngol**. V. 82(2), P. 203–208, 2016.

SOLOMONS E FRYHLE, T. W. G., **Química Orgânica**. 8ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, Editora Ltda., 2005, Vol.1.

SUGANO, Y. et al. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, v. 10, n. 1, 2005.

UCKO, David A. **Química para as ciências da saúde**: uma introdução a química geral, inorgânica e biológica. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992.