



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARIA LUIZA CAVALCANTI LUCENA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA SIMPLIFICADA DE OBTENÇÃO DE  
SELANTE DE FIBRINA AUTÓLOGO COM INCORPORAÇÃO DE AGENTE  
ANTIMICROBIANO À FORMULAÇÃO**

Recife  
2022

MARIA LUIZA CAVALCANTI LUCENA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA SIMPLIFICADA DE OBTENÇÃO DE  
SELANTE DE FIBRINA AUTÓLOGO COM INCORPORAÇÃO DE AGENTE  
ANTIMICROBIANO À FORMULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador (a): Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina Lima Leite

Recife

2022

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Lucena, Maria Luiza Cavalcanti

Desenvolvimento de metodologia simplificada de obtenção de selante de fibrina autólogo com incorporação de agente antimicrobiano à formulação / Maria Luiza Cavalcanti Lucena. – 2022.

60 f. : il.

Orientadora: Dra. Ana Cristina Lima Leite.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Tecnologia farmacêutica. 2. Biotecnologia. 3. Agentes anti-infecciosos I. Leite, Ana Cristina Lima (orientadora). II. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-137

MARIA LUIZA CAVALCANTI LUCENA

**Desenvolvimento de metodologia simplificada de obtenção de selante de fibrina autólogo com incorporação de agente antimicrobiano à formulação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

.

Aprovado em: 27/06/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Cristina Lima Leite (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Dr. Thiers Araujo Campos (Examinador Externo)

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Lucia Figueiredo Porto (Examinadora Externa)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e à espiritualidade amiga, que estiveram sempre presentes nessa jornada.

Aos meus pais, Antônio e Sheyla, por serem meus grandes orientadores, na pesquisa acadêmica e na vida. Pelo apoio incondicional, colo e palavras de incentivo. À minha irmã Bruna, por ser a melhor amiga em todos os momentos. A Molly, que tantas vezes me fez companhia enquanto redigia essa dissertação.

A Symon, por todo amor, carinho, suporte e paciência durante mais essa etapa, assim como em todas as demais que se seguirão ao longo da nossa vida.

A minha orientadora, Professora Dr. Ana Cristina Lima Leite, expresso minha imensa gratidão pela generosidade e confiança de sempre.

Aos colegas do LBHEMO, pelos bons momentos compartilhados.

À Virgínia Florêncio e toda equipe dos setores de Fracionamento e Controle de Qualidade de Hemocomponentes do HEMOPE, pelo auxílio prestado durante a realização desse trabalho.

Aos meus professores da pós-graduação, que foram tão importantes no meu processo de aprendizagem e aos funcionários do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação, muito obrigada.

## RESUMO

Selantes de fibrina são majoritariamente compostos por fibrinogênio e trombina, que quando misturados mimetizam a etapa final da cascata da coagulação, formando o coágulo de fibrina. Esses selantes são amplamente utilizados em procedimentos cirúrgicos devido a suas propriedades físicas e biológicas, que apresentam vantagens em comparação a materiais de origem sintética utilizados nas suturas tradicionais. Dentre estas vantagens, destacam-se: uma maior compatibilidade fisiológica, biodegradabilidade e uma melhor recuperação do paciente pós-cirurgia. A matriz de fibrina também vem sendo amplamente estudada como um sistema de transporte e entrega de células, fatores de crescimento, genes e fármacos. Essa característica faz com que antibióticos incorporados aos selantes de fibrina venham sendo testados para o combate das Infecções de Sítio Cirúrgico (ISC). No entanto, a produção de selantes de fibrina pela indústria farmacêutica de hemoderivados necessita de um grande aparato tecnológico, o que tende a elevar o custo de sua produção. Nesse sentido, esse trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia simples e de baixo custo para obter selante de fibrina autólogo e incorporar um agente antimicrobiano à formulação. Para isso, foram fracionadas fontes de fibrinogênio (crioprecipitado) e protrombina (euglobulinas plasmáticas) de unidades individuais de plasma com sorologia negativa, utilizando métodos de precipitação proteica físico-químicos. A integridade da protrombina precipitada foi avaliada qualitativamente por meio do teste de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa). A protrombina foi convertida em trombina pela adição de 10 mL de carbonato de cálcio 0,2M. A dosagem de fibrinogênio indicou a presença de  $1,5\text{g/dL} \pm 0,9$  dessa proteína no crioprecipitado, enquanto a trombina apresentou uma concentração de  $388,66 \pm 98,72 \text{ UI/mL}$ . À solução de trombina foram incorporados diferentes volumes de agente antimicrobiano (cloridrato de vancomicina 50 mg/mL ou sulfato de gentamicina 40 mg/mL). Promoveu-se a formação do coágulo com a adição de crioprecipitado e foram verificadas suas características macroscópicas. Os coágulos formados a partir da solução de trombina com maiores concentrações de antibiótico apresentaram menores consistência e adesão à parede do tubo em comparação com o controle. Ao final, foi realizado um ensaio microbiológico automatizado BACTEC™ FX para avaliação da atividade antimicrobiana do selante de fibrina enriquecido com antibióticos frente a *Staphylococcus aureus*, uma das principais espécies causadoras

das ISC. A matriz foi capaz de inibir o crescimento bacteriano local por até 72 horas. A metodologia desenvolvida nesse trabalho mostrou-se eficaz para a produção de um selante de fibrina, a nível de hemocentro, com capacidade para prevenir ISC. O desenvolvimento de uma metodologia simples e de baixo custo para obtenção de uma matriz de fibrina possui relevância, para além da prática clínica e cirúrgica, nas mais diversas áreas de pesquisa e inovação terapêutica; dado a versatilidade desse material biológico e a grande perspectiva de utilização em estudos de tecnologia farmacêutica e medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** fibrina; hemoderivados; plasma; selantes biológicos; trombina.

## ABSTRACT

Fibrin sealants are mainly composed of fibrinogen and thrombin, which when mixed mimic the final stage of the coagulation cascade, forming the fibrin clot. These sealants are widely used in surgical procedures due to their physical and biological properties, which have advantages compared to materials of synthetic origin used in traditional sutures. Among these advantages, we highlight: greater physiological compatibility, biodegradability and better recovery of the patient after surgery. The fibrin matrix has also been widely studied as a system for carrying and delivering cells, growth factors, genes and drugs. This characteristic leads the tests of antibiotics incorporated into fibrin sealants to combat Surgical Site Infections (SSI). However, the production of fibrin sealants by the pharmaceutical industry of blood products requires a large technological apparatus, which tends to increase the cost of its production. In this sense, this work aims to develop a simple and low cost methodology to obtain autologous fibrin sealant and incorporate an antimicrobial agent to the formulation. For this purpose, sources of fibrinogen (cryoprecipitate) and prothrombin (plasma euglobulins) were fractionated from individual plasma units with negative serology, using physical-chemical protein precipitation methods. The integrity of the precipitated prothrombin was evaluated qualitatively by means of the Activated Partial Thromboplastin Test. Prothrombin was converted to thrombin by the addition of 10 mL of 0.2M calcium carbonate. The fibrinogen dosage indicated the presence of 1.5g/dL  $\pm$  0.9 of this protein in cryoprecipitate, while thrombin had a concentration of 388.66  $\pm$  98.72 IU/mL. Different volumes of antimicrobial agent (vancomycin hydrochloride 50 mg/mL or gentamicin sulfate 40 mg/mL) were incorporated into the thrombin solution. The formation of the clot was promoted with the addition of cryoprecipitate and its macroscopic characteristics were verified. The clots formed from the thrombin solution with higher antibiotic concentrations showed lower consistency and adhesion to the tube wall compared to the control samples. At the end, an automated microbiological assay BACTEC™ FX was performed to evaluate the antimicrobial activity of fibrin sealant enriched with antibiotics against *Staphylococcus aureus*, one of the main causative species of SSI. The matrix was able to inhibit local bacterial growth for up to 72 hours. The methodology developed in this work proved to be effective for the production of a fibrin sealant, at a blood center manufacturing scale, with capacity to prevent SSI. The development of a simple and low-cost methodology for obtaining a



fibrin matrix is relevant in the most diverse areas of therapeutic research and innovation, due to the versatility of this biological material and the great prospect of use in studies of pharmaceutical technology and regenerative medicine.

**Keywords:** fibrin; blood products; plasma; fibrin glue; thrombin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da cascata da coagulação.....	20
Figura 2 – Representação da molécula de fibrinogênio e seus domínios (C, D e E).....	21
Figura 3 – Estrutura molecular em 3 dimensões da trombina humana e suas cadeias A e B.....	22
Figura 4 – Fluxograma da técnica de obtenção de fibrinogênio e trombina humanos a partir de uma única unidade de plasma.....	38
Figura 5 – (A) 10 mL de solução contendo trombina humana / (B) fração proteica correspondente ao crioprecipitado (indicado pela seta), formada na bolsa de plasma sob temperatura de 4°C.....	39
Figura 6 – Coágulos resultantes do teste de TTPa no fundo dos tubos de ensaio, indicando que houve ativação da protrombina em trombina e consequente coagulação plasmática.....	42
Figura 7 – Coágulos de fibrina fortemente aderidos ao fundo dos tubos de ensaio após mistura de solução de trombina e crioprecipitado rico em fibrinogênio.....	45
Figura 8 – Curva de calibração obtida pelo método de Clauss invertido para dosagem de trombina.....	46
Figura 9 – (A) tubo controle / (B) coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de cloridrato de vancomicina na proporção de 1:40/ (C): coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de cloridrato de vancomicina na proporção de 1:10.....	51
Figura 10 – (A) coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de sulfato de gentamicina na proporção de 1:10 / (B): coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de cloridrato de vancomicina na proporção de 1:10.....	51

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais técnicas de inativação viral utilizadas para a fabricação de selantes de fibrina na indústria de hemoderivados.....	24
Quadro 2 – Síntese das vantagens e desvantagens do selante de fibrina industrial e do fabricado a partir de uma única unidade de plasma (autólogo e heterólogo).....	27
Quadro 3 – Principais estudos pioneiros in vivo baseados na matriz de fibrina como <i>Drug Delivery</i> .....	29
Quadro 4 – Comparativo entre a TRB-L e diferentes trombinas de origem humana purificadas para utilização em selantes de fibrina segundo fabricante, origem, concentração e preço.....	49
Quadro 5 – Resultado qualitativo do ensaio microbiológico automatizado BACTEC™ FX para a atividade de cloridrato de vancomicina 50 mg/dL incorporado a matriz de fibrina frente a espécie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
Quadro 6 – Resultado qualitativo do ensaio microbiológico automatizado BACTEC™ FX para a atividade de sulfato de gentamicina 40 mg/dL incorporado a matriz de fibrina frente a espécie <i>Staphylococcus aureus</i> .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Adição de cloridrato de vancomicina 50 mg/mL e sulfato de gentamicina 40 mg/mL a amostras de solução de trombina, nas proporções 1:10; 1:20; 1:40, para realização do teste de formação de coágulo.....	36
Tabela 2 – Concentrações de fibrinogênio (mg/dL) nas amostras de crioprecipitado determinadas por ensaio coagulométrico automatizado.....	39
Tabela 3 – Análise estatística descritiva do resultado das dosagens de fibrinogênio em amostras de crioprecipitado.....	40
Tabela 4 – Resultado da avaliação qualitativa da atividade da Protrombina plasmática utilizando a técnica de TTPa para a promoção da coagulação.....	41
Tabela 5 – Resultados dos testes de formação de coágulo após ressuspensão do precipitado de Euglobulinas com diferentes fontes de cálcio.....	43
Tabela 6 – Obtenção de diferentes concentrações conhecidas de trombina padrão e tempo de coagulação para a elaboração da curva de calibração.....	46
Tabela 7 – Resultado da determinação da concentração das soluções de trombina humana por meio da metodologia de Clauss invertida	47
Tabela 8 – Análise estatística descritiva do resultado das dosagens de concentração de trombina.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
CRIO	Crioprecipitado
Cys	Cisteína
kDa	Quilo Dalton
FI	Fator I da coagulação
FIa	Fator I da coagulação ativado
FII	Fator II da coagulação
FIIa	Fator II da coagulação ativado
FV	Fator V da coagulação
FVa	Fator V da coagulação ativado
FVII	Fator VII da coagulação
FVIIa	Fator VII da coagulação ativado
FVIIa-TF	Complexo Fator VII da coagulação ativado + Fator Tecidual
FVIII	Fator VIII da coagulação
FVIIIa	Fator VIII da coagulação ativado
FIX	Fator IX da coagulação
FIXa	Fator IX da coagulação ativado
FX	Fator X da coagulação
FXa	Fator X da coagulação ativado
FXI	Fator XI da coagulação
FXIa	Fator XI da coagulação ativado
FXII	Fator XII da coagulação
FXIIa	Fator XII da coagulação ativado
FXIII	Fator XIII da coagulação
FXIIIa	Fator XIII da coagulação ativado
Gla	Gama-carboxiglutamato
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
TF	Fator Tecidual
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual

M	mol/litro
MDR	Multi droga-resistente
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micro metros
$\mu$ L	Micro litros
PL	Fosfolípideo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	<b>Geral.....</b>	<b>17</b>
1.1.2	<b>Específicos.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA.....	18
2.1.1	<b>Fibrinogênio.....</b>	<b>20</b>
2.1.2	<b>Trombina.....</b>	<b>21</b>
2.2	O SELANTE DE FIBRINA COMO MEDICAMENTO HEMODERIVADO: ASPECTOS DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL, REGULATÓRIOS E PERSPECTIVAS COM BASE NO MERCADO MUNDIAL.....	23
2.3	O SELANTE DE FIBRINA AUTÓLOGO E OS DESAFIOS PARA GARANTIA DA SEGURANÇA DO PRODUTO FINAL.....	26
2.4	A MATRIZ DE FIBRINA COMO SISTEMA DE CARREAMENTO E ENTREGA DE MOLÉCULAS.....	28
2.5	A INCORPORAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM MATRIZES DE FIBRINA PARA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO (ISC).....	30
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>33</b>
3.1	DECLARAÇÃO DE ÉTICA.....	33
3.2	OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE FIBRINOGENIO E TROMBINA PLASMÁTICOS PARA FORMULAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA.....	33
3.2.1	<b>Obtenção do crioprecipitado.....</b>	<b>33</b>
3.2.2	<b>Dosagem de Fibrinogênio no Crioprecipitado.....</b>	<b>33</b>
3.2.3	<b>Precipitação das Euglobulinas plasmáticas.....</b>	<b>34</b>
3.2.4	<b>Avaliação qualitativa da atividade da Protrombina Plasmática utilizando a técnica do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa).....</b>	<b>34</b>

3.2.5	<b>Padronização da concentração de cálcio para conversão da protrombina em trombina.....</b>	35
3.2.6	<b>Teste de formação de coágulo de fibrina.....</b>	35
3.2.7	<b>Determinação da concentração da solução contendo Trombina Humana.....</b>	35
3.3	<b>INCORPORAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS À SOLUÇÃO DE TROMBINA E TESTE DE FORMAÇÃO DE COÁGULO.....</b>	36
3.4	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS A MATRIZ DE FIBRINA FRENTE À ESPÉCIE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>.....</b>	37
3.4.1	<b>Preparo do inóculo.....</b>	37
3.4.2	<b>Ensaio microbiológico.....</b>	37
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	38
4.1	<b>OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE FIBRINOGENIO E TROMBINA PLASMÁTICOS PARA FORMULAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA.....</b>	38
4.1.1	<b>Dosagem de Fibrinogênio no Crioprecipitado.....</b>	39
4.1.2	<b>Avaliação qualitativa da atividade da Protrombina Plasmática utilizando a técnica do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa).....</b>	41
4.1.3	<b>Padronização da concentração de cálcio para conversão da protrombina em trombina e Teste de formação de coágulo.....</b>	43
4.1.4	<b>Determinação da concentração da solução contendo Trombina Humana.....</b>	46
4.2	<b>INCORPORAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS À SOLUÇÃO DE TROMBINA E TESTE DE FORMAÇÃO DE COÁGULO.....</b>	50
4.3	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS A MATRIZ DE FIBRINA FRENTE A ESPÉCIE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>.....</b>	52
5	<b>CONCLUSÃO.....</b>	53
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	54



## 1 INTRODUÇÃO

A necessidade de gerenciar de forma eficaz a hemostasia e o selamento tecidual durante cirurgias levou ao desenvolvimento de técnicas cirúrgicas modernas nas últimas décadas. Apesar de viáveis nas cirurgias em geral, abordagens tradicionais envolvendo suturas, grampos e fios, dificilmente podem ser aplicados de forma minimamente invasiva, por exigirem um manuseio extenso; provocarem danos teciduais, aumentarem o risco de uma possível infecção e, por vezes, não proporcionarem selamento tecidual completo e imediato. Nesse contexto surgiram os Selantes de Fibrina (BURNOUF *et al.*, 2009; SPOTNITZ, 2010).

Produtos hemostáticos de uso tópico derivados do sangue humano, como os Selantes de Fibrina (também conhecidos como colas de fibrina), são amplamente utilizados na prática médica e procedimentos cirúrgicos devido a suas propriedades físicas e biológicas, que apresentam vantagens em comparação a materiais de origem sintética utilizados nas suturas tradicionais (CASHMAN *et al.*, 2013; COSKUN; YARDIMCI, 2017; DAUD *et al.*, 2020). Entre estas vantagens podemos destacar: uma maior compatibilidade fisiológica, levando a uma menor imunogenicidade; a biodegradabilidade e uma melhor recuperação do paciente pós-cirurgia (ZHANG, 2021).

A composição dos Selantes de Fibrina consiste majoritariamente em duas proteínas plasmáticas: fibrinogênio e trombina (ANVISA, 2019). No local da aplicação, um dispositivo com duas seringas (cada uma contendo um concentrado de fibrinogênio e de trombina, respectivamente) é acionado, disparando seu conteúdo simultaneamente. Os concentrados de fibrinogênio e trombina são misturados em um compartimento próprio para essa finalidade antes de atingirem o tecido (ZHANG, 2021). As duas proteínas, quando misturadas, mimetizam a etapa final da cascata da coagulação, em que o fibrinogênio é convertido em fibrina pela ação da trombina. Como resultado dessa reação enzimática, há a formação de um gel aderente ao tecido humano: o coágulo de fibrina (RODRIGUEZ-MERCHAN, 2017; ZHANG, 2021).

A possibilidade do uso de coágulos de fibrina como agentes hemostáticos foi primeiramente descrita em 1909, pelo cientista alemão Bergel, que utilizou plasma seco como fonte de fibrinogênio para realizar hemostasia (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013). No entanto, apenas em 1978 o primeiro Selante de Fibrina industrial (Tisseel®), que continha concentrados de fibrinogênio obtido de múltiplas doações de

plasma humano e trombina bovina, passou a ser produzido e comercializado no continente europeu (SPOTNITZ, 2010).

Os Selantes de Fibrina comercialmente disponíveis atualmente consistem em preparações ricas em fibrinogênio e trombina humanos, ambos liofilizados, além de agentes estabilizadores como Fator XIII da coagulação e antifibrinolíticos (ANVISA, 2019). São manufaturados pela indústria farmacêutica de hemoderivados e, para tal, necessitam de um grande aparato tecnológico, que envolve técnicas de cromatografia de afinidade e troca iônica, o que tende a elevar o custo de sua produção (BURNOUF, 2018).

Nesse sentido, o desenvolvimento de uma metodologia de baixo custo para obtenção de selantes de fibrina autólogos, preparados a partir de uma única doação plasmática, para utilização em hemocentros, aliado à incorporação de agentes antimicrobianos que previnam infecções de sítio cirúrgico, poderia apresentar-se como uma alternativa para a viabilização do uso desse produto hemostático.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

Desenvolver uma metodologia simples e de baixo custo para obter selante de fibrina autólogo e incorporar um agente antimicrobiano à formulação.

### 1.1. 2 Específicos

- a) Padronizar uma técnica de obtenção de trombina e fibrinogênio humanos a partir de metodologias simples de precipitação de proteínas plasmáticas;
- b) Formular o selante de fibrina;
- c) Avaliar a capacidade coagulante do produto obtido;
- d) Incorporar o agente antimicrobiano na matriz de fibrina e avaliar sua atividade contra a espécie bacteriana *Staphylococcus aureus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FISIOLOGIA DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

O Processo da coagulação sanguínea baseia-se em eventos complexos nos quais ocorrem interações entre proteínas pró-coagulantes, anticoagulantes, plaquetas e endotélio dos vasos (COVAS, 2007). O sistema da coagulação consiste em uma série de reações bioquímicas em cascata, cujo resultado final é a transformação do sangue líquido e fluido em um coágulo. Para isso, há a conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis fibrina (redes de fibrina), na última etapa da cascata de reações (RANG, 2001).

A formação da rede de fibrina envolve duas vias específicas, extrínseca e intrínseca, que convergem para formação de uma via comum. Os componentes principais de cada via são os chamados fatores da coagulação, glicoproteínas sintetizadas majoritariamente no fígado. Dentro das vias os fatores da coagulação são convertidos da sua forma inativa (zimogênio), à forma ativa, por meio de uma clivagem proteolítica. O produto proteico de uma reação dá início a reação subsequente e por isso o processo é conhecido como cascata da coagulação (FERRIER, 2019).

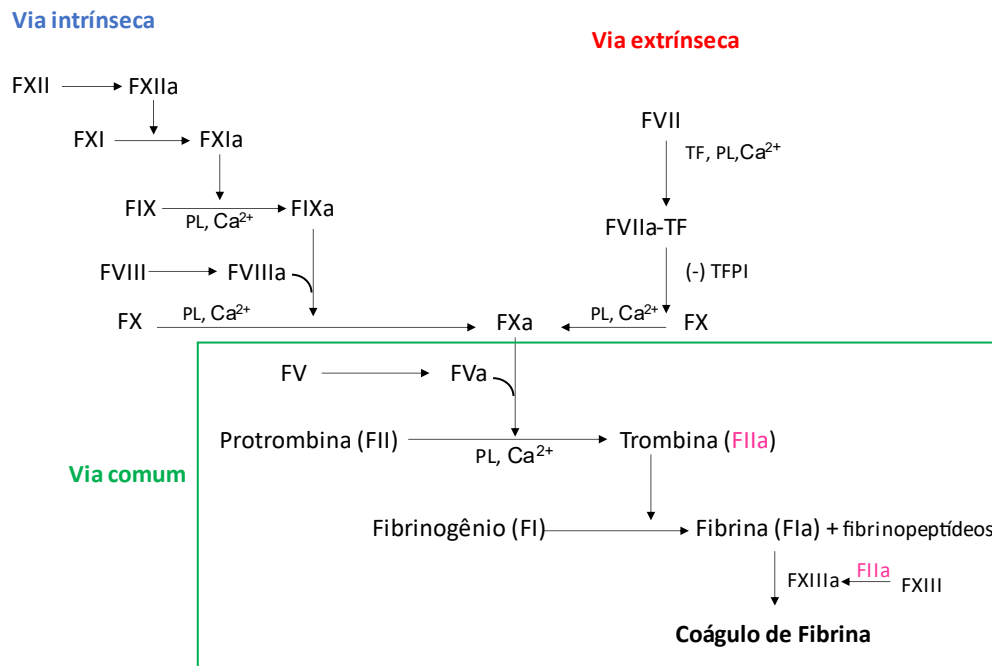
A via extrínseca envolve primeiramente o fator tecidual (TF, do inglês *tissue factor*), ou Fator III da coagulação (FIII), glicoproteína transmembrana que, embora não esteja presente circulante no sangue, passa a estar exposta quando os vasos sanguíneos sofrem lesão. Uma lesão do endotélio que exponha o FIII no sangue inicia rapidamente a via extrínseca, também conhecida como via do fator tecidual. Uma vez exposto, o TF liga-se ao Fator VII da coagulação (FVII), que assim como o FIII é exclusivo da via extrínseca, ativando-o por meio de uma mudança conformacional. A ligação do FVII ao TF necessita da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e de fosfolipídios. O complexo TF–FVIIa liga-se ao Fator X da coagulação (FX), ativando-o por proteólise. Portanto, pode-se afirmar que a ativação do FX pela via extrínseca ocorre associada à membrana celular. O mecanismo de regulação para a inativação da via extrínseca se dá pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI, do inglês *tissue factor pathway inhibitor*); este liga-se ao complexo TF–FVIIa e, de forma dependente do FXa, impedindo a produção subsequente deste fator (FERRIER, 2019).

Na via intrínseca, diferentemente do exposto no parágrafo anterior, todos os fatores da coagulação envolvidos estão presentes na circulação sanguínea. Essa via

envolve duas fases: a fase de contato e a fase de ativação do FX. A fase de contato resulta na ativação do FXII (também conhecido como fator de Hageman), por alteração conformacional resultante da ligação a uma superfície carregada negativamente. A sequência de eventos que leva à ativação do FX a FXa pela via intrínseca é iniciada pelo FXIIa. O FXIIa ativa o FXI, e o FXIa ativa o FIX, uma serina-protease que contém gama-carboxiglutamato. O FIXa combina-se com o FVIIIa e este complexo ativa o FX, outra serina-protease que contém gama-carboxiglutamato. O complexo contendo FIXa, FVIIIa e FX forma-se em regiões expostas da membrana, carregadas negativamente, e o FX é ativado a FXa. Este complexo é, por vezes, denominado complexo Xase. A sua ligação aos fosfolípidos da membrana requer íons  $\text{Ca}^{2+}$  (FERRIER, 2019).

O Fator X ativado (FXa) produzido pelas vias intrínseca e extrínseca inicia a via comum, uma sequência de reações que resulta na geração de fibrina. O FXa associa-se ao Fator V ativado (FVa) e, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos, forma um complexo ligado à membrana conhecido como protrombinase. Este complexo cliva a protrombina (FII) em trombina (FIIa), processo que ocorre pela ligação dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  aos resíduos de gama-carboxiglutamato presentes no FII, removendo-os. A trombina (FIIa), por sua vez, é capaz de clivar o fibrinogênio (FI), liberando fibrinopeptídeos A e B e convertendo-o em fibrina (FIIa). Devido à perda de carga, os monômeros de FIIa passam a ser capazes de associar-se de forma não covalente em uma espécie de matriz desorganizada, formando um coágulo frouxo (solúvel) de fibrina. O Fator XIII da coagulação, uma transglutaminase que também é ativada pela trombina, liga covalentemente o grupo gama-carboxamida de um resíduo de glutamina de uma molécula de FIIa ao grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo de lisina de outra molécula, formando uma ligação isopeptídica e liberando amônia, resultando em um coágulo mais resistente e estável (FERRIER, 2019), cuja estrutura pode variar de acordo com espessura das fibras, número de pontos de ramificação, porosidade e permeabilidade dos géis, dependendo das condições de polimerização, como concentrações de fibrinogênio e trombina, concentração de sal, pH, temperatura e a presença de outras proteínas plasmáticas (por exemplo, fibronectina e albumina) (BROWN; BARKER, 2014; NOORI, 2017). A representação esquemática da cascata da coagulação está ilustrada na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática da cascata da coagulação



a = ativo; F = fator; TF = fator tecidual; TFPI = inibidor da via do fator tecidual; PL = fosfolípido; Ca<sup>2+</sup> = cálcio; Gla = gama-carboxiglutamato.

Fonte: A autora (2022).

Quando o coágulo não é mais necessário, a fibrinólise é ativada para dissolver eficientemente os coágulos e evitar a trombose. A plasmina que circula no sangue como precursor do plasminogênio é considerada a principal enzima fibrinolítica. O plasminogênio adere ao coágulo de fibrina e é ativado em plasmina pela ação de ativadores de plasminogênio. Após a ativação, a plasmina cliva a fibrina em locais específicos e libera produtos solúveis da digestão da fibrina no sangue circulante (CHERNYSHI *et al.*, 2015).

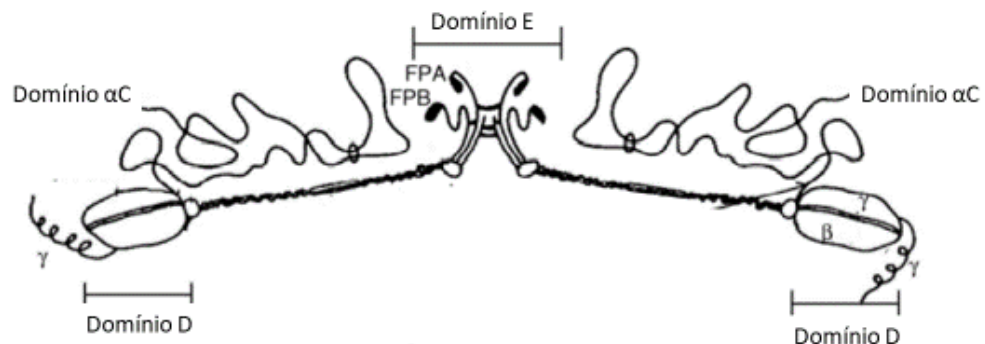
### 2.1.1 Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína solúvel sintetizada pelo fígado e é considerada a principal proteína estrutural do plasma humano, onde está presente em uma concentração de 2-4 mg/mL (JENKINS *et al.*, 2018). A molécula de fibrinogênio consiste em um dímero composto por três cadeias polipeptídicas diferentes: A $\alpha$  (610 resíduos de aminoácidos), B $\beta$  (461 resíduos de aminoácidos) e  $\gamma$  (sendo 411 resíduos de aminoácidos presentes em sua forma majoritária:  $\gamma$ A) unidas por pontes dissulfeto, com uma massa molecular total igual a 340 KDa (BUTERA; HOGG, 2020). As porções

N-terminais das cadeias polipeptídicas se unem para formar o domínio E, ao centro da molécula, enquanto dois domínios D são formados pelas porções C-terminais das cadeias B $\beta$  e por uma pequena fração das cadeias  $\gamma$  e A $\alpha$ . As porções C-terminais da cadeia A $\alpha$  projetam-se dos domínios D e formam outros dois domínios denominados  $\alpha$ C (Figura 2). O domínio central (domínio E) possui uma carga elétrica residual negativa, o que resulta em repulsão entre moléculas de Fibrinogênio.

Durante a reação de conversão de fibrinogênio em fibrina, catalisada pela trombina, os fibrinopeptídeos A (FPA) e B (FPB) são separados das cadeias A $\alpha$  e B $\beta$ , respectivamente (PIETERS; WOLBERG, 2019). A molécula de fibrinogênio possui três sítios de ligação altamente específicos para o Ca<sup>2+</sup>: um localizado no domínio E, e outros dois nos domínios; além disso, possui também sítios de ligação específicos para o FXIII (situados na porção C-terminal da cadeia  $\gamma$ ) e trombina (porção C-terminal da cadeia  $\gamma$  e domínio E central). A integridade desses sítios de ligação é importante para a manutenção das propriedades de polimerização da proteína (PIETERS; WOLBERG, 2019; GAULE; AJJAN, 2021).

Figura 2 – Representação da molécula de fibrinogênio e seus domínios (C, D e E)



FPA: fibrinopeptídeos A / FPB: fibrinopeptídeos B  
 Fonte: Adaptada de Bertolini, Goss e Curling (2013, p. 197).

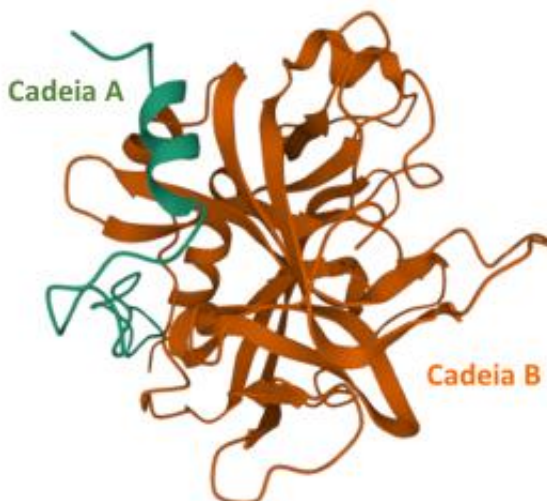
### 2.1.2 Trombina

A trombina (FIIa) é uma enzima proteolítica do tipo serina-protease, formada nos estágios finais da cascata da coagulação. Tem como precursora a protrombina (FII), que integra o grupo das Euglobulinas plasmáticas (ALVES *et al.*, 2021) e está presente no plasma humano em uma concentração média de 110 mg/mL (AHMAD *et al.*, 2015). A estrutura molecular da trombina consiste em duas cadeias polipeptídicas ligadas covalentemente entre si por pontes dissulfeto, entre Cys1 e Cys122: cadeia A,

que contém 36 aminoácidos residuais; e cadeia B, com 259 aminoácidos residuais, onde se encontram seus principais sítios ativos de ligação (Figura 3). A cadeia A tem recebido pouco enfoque em estudos a respeito da trombina é considerada apenas um apêndice do processo de ativação da protrombina, sendo até mesmo dispensável para essa função (DI CERA, 2008). No entanto, várias mutações naturais da molécula proteica envolvem resíduos da cadeia A (PELC *et al.*, 2022).

Na superfície da molécula de trombina estão dois sítios específicos chamados Exosítios I e II. O Exosítio I contém vários resíduos de aminoácidos positivamente carregados, dando origem a um intenso campo eletrostático. Esse exosítio é importante para ligação da trombina ao domínio E da molécula de fibrinogênio, durante a conversão desse em fibrina (KAHLER *et al.*, 2020). Do lado oposto ao Exosítio I, uma estrutura em hélice C-terminal e seus domínios vizinhos hospedam um número de resíduos positivamente carregados e formam o Exosítio II, responsável, entre outras coisas, por promover a ligação da trombina à cadeia  $\gamma$  da molécula de fibrinogênio (DI CERA, 2008; XIAO, 2018; KAHLER *et al.*, 2020).

Figura 3 – Estrutura molecular em 3 dimensões da trombina humana e suas cadeias A e B



Fonte: Protein Data Bank (PDB): <http://rcsb.org> (2022).

Além de cumprir um papel fundamental na cascata da coagulação sanguínea, a trombina também desempenha outras importantes funções fisiológicas relacionadas à hemostasia: estimula a agregação plaquetária e a proliferação celular e modula a contração da musculatura lisa. Esses efeitos são desencadeados pela interação da trombina com receptores específicos acoplados à proteína G (FERRIER, 2019).

## 2.2 O SELANTE DE FIBRINA COMO MEDICAMENTO HEMODERIVADO: ASPECTOS DA PRODUÇÃO INDUSTRIAL, REGULATÓRIOS E PERSPECTIVAS COM BASE NO MERCADO MUNDIAL

De acordo com a Instrução Normativa N° 137 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os medicamentos hemoderivados são aqueles derivados do sangue ou plasma humanos preparados com base em hemocomponentes, por meio de um processo de fracionamento industrial realizado por estabelecimentos públicos ou privados (BRASIL, 2022). Nessa categoria encontra-se o Selante de Fibrina (ou Cola de Fibrina), que pode ser definido como uma preparação farmacêutica, estéril e apirogênica, constituída por um conjunto contendo dois componentes: o concentrado de fibrinogênio e uma preparação que contém trombina humana (ANVISA, 2019) e cujas especificações de fabricação e controle de qualidade encontram-se disponibilizadas na Farmacopeia Brasileira. Sua produção industrial deve estar baseada no cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos Biológicos e Boas Práticas do Ciclo Produtivo do Sangue, conforme a legislação vigente, visando garantir a sua qualidade, segurança e eficácia.

A produção industrial dos selantes de fibrina é realizada pelo fracionamento de milhares de litros de plasma humano (BURNOUNF, 2018). O fibrinogênio é mais comumente obtido a partir da fração I do método de Cohn, baseada na técnica de precipitação plasmática desenvolvida por Cohn e colaboradores em 1946 e que consiste na aplicação de um gradiente de etanol, pH e temperatura para obtenção de cinco frações contendo diferentes proteínas plasmáticas (COHN *et al.*, 1946), ou do crioprecipitado, definido como a fração de plasma insolúvel em frio, obtida a partir do plasma fresco congelado, contendo glicoproteínas de alto peso molecular, principalmente fator VIII, fator de Von Willebrand, fator XIII e fibrinogênio (BRASIL, 2017); seguido de uma etapa de ultrafiltração, que aumenta a concentração do produto para cerca de 80 g/L; uma ou mais etapas de inativação/ remoção viral que demonstrem a eliminação ou inativação dos agentes infecciosos virais conhecidos (BERTOLINI; GOSS; CURLING, 2013; BURNOUNF, 2018). De acordo com a farmacopeia brasileira, caso sejam utilizadas substâncias químicas para inativar os vírus durante a produção, o processo de purificação posterior deve demonstrar, mediante validação, que a concentração das substâncias inativadoras foi eliminada ou reduzida a níveis aceitáveis segundo normas vigentes e que os eventuais resíduos



não possam vir a trazer riscos aos pacientes (ANVISA, 2019). Os principais métodos para inativação e remoção viral utilizados na preparação de fibrinogênio pela indústria de hemoderivados, eficazes contra vírus envelopados (como os vírus das hepatites B e C e da imunodeficiência humana adquirida) são: solvente/detergente (S/D); pasteurização, tratamento por vapor aquecido e nanofiltração (BURNOUF *et al.*, 2019). Um resumo das técnicas de inativação viral está apresentado no quadro 1. Outras medidas que reforçam a segurança desses produtos são: a triagem dos doadores de sangue (que devem estar saudáveis e cumprirem os requisitos dispostos na legislação vigente) e testagem sorológica e antigênica de cada doação, individualmente. As unidades de plasma devem apresentar o resultado negativo para anticorpos contra o vírus tipo 1 e tipo 2 da imunodeficiência humana (anti-HIV-1 e anti-HIV-2); anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) e o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) (BRASIL, 2017; ANVISA, 2019).

Quadro 1 – Principais técnicas de inativação viral utilizadas para a fabricação de selantes de fibrina na indústria de hemoderivados

Inativação viral	Solvente/Detergente (S/D)	Combinação de tri- <i>n</i> -butilfosfato e detergentes (Triton X100, Tween 80) por um dado período de tempo. A inativação viral se dá pelo rompimento do envelope viral. Após o tratamento com S/D, o produto precisa passar por um processo de cromatografia para retirada dos reagentes.
	Pasteurização	Aquecimento a 60° durante 10 horas. A depender da natureza do produto, pode ser adicionado um agente termo-protetor, que deverá ser posteriormente removido por diafiltração.

	Vapor aquecido	Exposição do produto a um gradiente de temperatura que vai de 50 a 121°C, sob atmosfera de gás inerte. O aumento da temperatura e a pressão de vapor são responsáveis pela inativação viral.
Remoção viral	Nanofiltração	Filtração do produto em membranas com poros de 0,22 µm.

Fonte: Adaptado de Burnouf (2018).

A trombina humana é obtida em escala industrial por um processo de ativação de frações plasmáticas contendo protrombina humana através de sais de cálcio (BURNOUF, 2009). O fluxo de produção envolve ainda combinações de técnicas de cromatografia e ultrafiltração, visando uma maior purificação e concentração final do produto (cerca de 500 UI/mL). Etapas de inativação e remoção viral também são necessárias, sendo solvente/detergente (S/D); pasteurização e nanofiltração as mais utilizadas (NOORI *et al.*, 2017).

As preparações de selantes de fibrina podem conter ainda outros ingredientes adjuvantes, como a fibronectina humana e um inibidor de plasmina, como a aprotinina, e estabilizadores, como a albumina humana, adicionados antes ou durante a formação da fibrina induzida pela trombina (ANVISA, 2019).

Os constituintes do Selante de Fibrina devem ser estéreis e apirogênicos, sendo então distribuídos assepticamente nos recipientes finais e imediatamente congelados. Os mesmos devem ser liofilizados e os recipientes fechados sob vácuo ou sob gás inerte de forma que se evite qualquer contaminação microbiana (ANVISA, 2019).

Selantes de Fibrina estão comercialmente disponíveis em diferentes marcas, como Tisseel® (Baxter Healthcare, Deerfield, USA), Evicel® (Ethicon, Somerville, USA), Beriplast P® (CSL Behring, King of Prussia, USA), entre outras. Na última década houve um grande progresso na pesquisa direcionada ao desenvolvimento de novos selantes cirúrgicos, bem como o refinamento dos já existentes, com objetivo de aumentar ainda mais a segurança do medicamento, seu desempenho adesivo e as propriedades mecânicas desse biomaterial (HEHER *et al.*, 2018b). o mercado de

Selantes de Fibrina ainda se encontra em notável expansão, com um crescimento de 13% ao ano, superando a marca de 9.7 bilhões de dólares em 2022, com um total de 30 empresas ao redor do mundo trabalhando no desenvolvimento de novos colas de fibrina (MEDMARKET DILIGENCE, 2016). Esse crescimento pode ser explicado pela aceitação cada vez maior dos selantes de fibrina pela classe médica para uso em cirurgias (LOPEZCARASA-HERNANDEZ *et al.*, 2021; SU *et al.*, 2021; ORLANDINI *et al.*, 2021; CHOUDHURY *et al.*, 2021), bem como a descoberta de novas aplicações para esse produto, que incluem o carreamento e entrega de fármacos (RUBALSKII *et al.*, 2019), células e biomoléculas (BUJOLI; SCIMECA; VERRON, 2019; DOMBROVSKAYA *et al.*, 2020); e a utilização da matriz de fibrina na engenharia de tecidos (NOORI *et al.*, 2017; SUBBIAH; GULDBERG, 2019).

Devido a já a bem estabelecida segurança e eficácia dos Selantes de Fibrina, uma maior disseminação de sua utilização na prática clínica pode depender apenas de uma maior competitividade de preços de mercado, já que se trata de um produto de altíssimo valor agregado (cerca de 100 dólares/mL, sendo necessários no mínimo 5 mL por procedimento cirúrgico) (YTHIER, 2020).

### 2.3 O SELANTE DE FIBRINA AUTÓLOGO E OS DESAFIOS PARA GARANTIA DA SEGURANÇA DO PRODUTO FINAL

Selantes de fibrina podem ser preparados em escala industrial, ou por meio de uma única doação de plasma, em hemocentros. Nesse caso, o hemoderivado pode ser preparado a partir do plasma do próprio doador (autólogo), ou do plasma de outro doador (heterólogo) (DIETRICH *et al.*, 2013). Em ambos os casos, a principal fonte de fibrinogênio utilizada é o crioprecipitado (CRIO), devido a um maior rendimento quando comparado a outras metodologias de precipitação dessa proteína, tais como a utilização de etanol, sulfato de amônio e polietilenoglicol como agentes precipitantes (BURNOUNF, 2009).

A obtenção do crioprecipitado se dá pelo descongelamento lento de uma unidade de Plasma Fresco Congelado (250-400 mL), a uma temperatura entre 1 e 6°C, seguido de uma centrifugação a 3000-4000 rpm, resultando em um volume aproximado de 15 mL do CRIO, contendo cerca de 150-250 mg de fibrinogênio em sua composição (BRASIL, 2015).

A trombina que compõe os selantes de fibrina autólogos pode ser derivada de animais bovinos, o que pode favorecer reações imunológicas adversas nos pacientes que fazem uso do produto (SPOTNITZ, 2020), ou do plasma humano, através de dispositivos desenvolvidos para ativar essa enzima na presença de polímeros esféricos carregados negativamente e sais de cálcio (SEMPLE; MADSEN; SEMPLE, 2005; KUMAR; CHAPMAN, 2007; CHENNA; SHASTRY; DAS, 2021). Esse tipo de sistema pode resultar em uma trombina com concentração entre 50 e 60 UI/mL, estável por até seis horas em temperatura ambiente, caso seja adicionado 10-15% de etanol na formulação final, antes da adição ao plasma (SEMPLE; MADSEN; SEMPLE, 2005; KUMAR; CHAPMAN, 2007; CHENNA; SHASTRY; DAS, 2021).

O selante de fibrina autólogo possui a vantagem de diminuir significativamente o risco de transmissão de doenças infecciosas transmitidas pelo sangue, além de menores índices de reações adversas decorrentes de sua utilização, em comparação com o selante heterólogo provindo de uma única doação ou com o selante comercial (NOORI *et al.*, 2017). Em contrapartida, existem limitações quanto a produção a partir do plasma de pacientes dos quais a coleta de sangue não é possível, como aqueles que possuem algum tipo de distúrbio da coagulação (BURNOUF, 2009). O Quadro 2 traz uma comparação das vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de selante de fibrina.

Quadro 2 – Síntese das vantagens e desvantagens do selante de fibrina industrial e do fabricado a partir de uma única unidade de plasma (autólogo e heterólogo)

	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Cola de fibrina industrial</b>	Padronização do conteúdo proteico	Alto custo
	Disponibilidade comercial	Maior risco de reações adversas
	Alta resistência à tração	
<b>Cola de fibrina fabricada a partir de uma única unidade de plasma</b>	Menor custo	Variabilidade lote a lote
	Menor risco de reações adversas (autóloga)	Menos ligações cruzadas de fibras de fibrina
		Baixa resistência à tração

Fonte: Adaptado de Noori *et al.* (2017).

O principal desafio na fabricação de selantes de fibrina obtidos a partir de uma única unidade de plasma, autólogos ou heterólogos, diz respeito a necessidade da implantação de um processo de inativação viral do produto final nos hemocentros onde estes são manipulados. A segurança antiviral dos selantes de fibrina de doadores

únicos baseia-se, atualmente, apenas na seleção adequada dos doadores e no rastreio, por meio de testes laboratoriais, de possíveis patógenos (BURNOUNF, 2018; BURNOUNF *et al.*, 2019). Faz-se necessário o cumprimento rigoroso das Boas Práticas de Fabricação e de Hemovigilância para garantir que este hemoderivado não seja uma fonte de infecção ao usuário.

## 2.4 A MATRIZ DE FIBRINA COMO SISTEMA DE CARREAMENTO E ENTREGA DE MOLÉCULAS

Os sistemas de carregamento e entrega de moléculas, também conhecido como sistemas de *Drug Delivery*, foram desenvolvidos com o objetivo primário de otimizar a eficiência terapêutica de fármacos (SUR *et al.*, 2019). Esses sistemas possuem a capacidade de controlar a distribuição de substâncias através de transportadores macromoleculares (WAGHULE *et al.*, 2019). Dentre os materiais que podem ser utilizados para desenvolvimento de sistemas de *Drug Delivery*, a matriz de fibrina destaca-se pelas suas propriedades estruturais, mecânicas e biológicas inerentes, como biocompatibilidade, estrutura tridimensional e tempo de degradação (MIRON; ZHANG, 2018). O conceito de carregamento e entrega de moléculas através de uma matriz de fibrina baseia-se na sua incorporação em uma formulação de fibrinogênio + trombina, posteriormente aplicada no local desejado, além dessa entrega também poder ser adaptada utilizando-se estruturas como microesferas ou nanopartículas para controlar a cinética de liberação da molécula entregue (RAJANGAM; AN, 2013; HERHER *et al.*, 2018).

O perfil de liberação de uma molécula bioativa depende do seu modo de interação com a fibrina (taxa de difusão) e das propriedades mecânicas da matriz em combinação com a atividade fibrinolítica na área de aplicação (taxa de degradação) (CHIU *et al.*, 2012). As principais abordagens para modular a cinética de liberação se concentraram em modificar as propriedades biofísicas da matriz de fibrina ou modificar a substância de interesse de forma a alterar a interação entre as duas (HEHER *et al.*, 2018a). As propriedades estruturais e mecânicas da matriz de fibrina podem ser modificadas variando sua composição, ou seja, as concentrações de fibrinogênio, trombina e FXIIIa. Esses parâmetros, até certo ponto, definem a microestrutura do coágulo (tamanho do poro, densidade), rigidez e resistência à fibrinólise e demonstraram afetar a cinética de liberação de substâncias (DE MELO *et al.*, 2020).

A matriz de fibrina vem se mostrando eficaz como sistema de entrega e liberação de diversas biomoléculas terapêuticas como fatores de crescimento, citocinas e antibióticos, além de variados tipos de células e partículas nanométricas que são capazes de limitar e contornar o sistema imunológico de modo a minimizar potenciais reações de corpo estranho nos tecidos do hospedeiro (HEHER *et al.*, 2018a). O Quadro 3 resume alguns dos principais estudos *in vivo*, pioneiros na utilização da matriz de fibrina como sistema de *Drug Delivery* em diferentes áreas da medicina.

Quadro 3 – Principais estudos pioneiros *in vivo* baseados na matriz de fibrina como *Drug Delivery*

<b>Aplicação médica</b>	<b>Molécula carregada</b>	<b>Conclusão</b>	<b>Referência</b>
Tratamento de úlcera crônica	Fator de crescimento aFGF	Aumento da angiogênese e crescimento de epitélio	Pandit <i>et al.</i> (1998)
Isquemia dos membros posteriores	Fator de crescimento bFGF e heparina	Aumento da angiogênese	Jeon <i>et al.</i> (2005)
Retalho isquêmico	Fator de crescimento VEGF <sub>165</sub>	Aumento da angiogênese	Mittermayr <i>et al.</i> (2008)
Ferimento cutâneo	Fatores de crescimento: VEGF <sub>165</sub> e PDGF-BB ligado a peptídeo PIGF2	Aumento da angiogênese e cura do ferimento	Martino <i>et al.</i> (2014)
Infecção por MDR <i>S. aureus</i>	Vancomicina	Supressão da infecção local e ferimento subcutâneo	Ozaki <i>et al.</i> (2014)
Infecção por MDR <i>S. aureus</i>	Estreptomicina e Tetraciclina	Eliminação efetiva da sepse peritoneal induzida por <i>S. aureus</i>	Woolverton <i>et al.</i> (1999); Woolverton <i>et al.</i> (2001)
Infecção por <i>P. aeruginosa</i>	Tobramicina	Redução do crescimento bacteriano na superfície córnea	Frucht-Perry <i>et al.</i> (1992)
Quimioterapia (retinoblastoma)	Topotecan	Regressão do tumor	Geer, Swartz e Andreadis (2005)
Quimioterapia (retinoblastoma)	Carboplatina	Regressão do tumor	Van Quill <i>et al.</i> (2005)

Regeneração epidérmica	Queratinócitos e fator de crescimento EGF	Aumento da re-epitelização	Gwak <i>et al.</i> (2005)
Odontogênese	Células-tronco mesenquimais caninas	Melhora na regeneração dentária e crescimento do dente completo	Ito <i>et al.</i> (2006)
Regeneração óssea	Adenovírus expressando gene BMP7	Aumento da formação óssea após implantação intramuscular	Schek, Hollister e Krebsbach (2004)
Regeneração epitelial	Adenovírus expressando gene eNOS	Aumento no índice de regeneração epitelial em úlceras crônicas.	Breen <i>et al.</i> (2008)
Neovascularização	Plasmídeo expressando gene PTN	Aumento da neovascularização na isquemia do miocárdio	Christman <i>et al.</i> (2005)
Retalho isquêmico	Plasmídeo expressando gene VEGF-A + lipofetamina	Melhora na angiogênese com elevada perfusão tecidual	Michlits <i>et al.</i> (2007)

Fonte: A autora (2022).

## 2.5 A INCORPORAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM MATRIZES DE FIBRINA PARA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES DE SÍTIO CIRÚRGICO (ISC)

As infecções de sítio cirúrgico (ISC) podem ocorrer em feridas criadas por um procedimento cirúrgico ou pós-operatória de qualquer cavidade, osso, articulação tecido ou próteses envolvidas e atualmente é considerada a complicação pós operatória mais comum, com significativa morbimortalidade, e representa 17% das infecções relacionadas à assistência à saúde (COSTA; SANTA-CRUZ; FERRAZ, 2021). Pacientes com ISC têm cinco vezes mais chances de serem readmitidos em 30 dias e duas mais de óbito, em comparação com aqueles que não a desenvolvem. Além disso, elas dobram a permanência e os custos hospitalares e, portanto, também representam problema econômico considerável para o sistema de saúde (ANDERSSON; SØREIDE; ANSARI, 2019).

Os organismos que causam as ISC são geralmente endógenos ao paciente, e provêm da pele ou de qualquer víscera que foi aberta em cirurgia, sendo

*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* multirresistente (MDRAB) e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (MDRP) os agentes contaminantes mais comuns (BANIASADI; ALAEEN; SHADMEHR, 2016; GESSMANN *et al.*, 2018). A antibioticoterapia tem como objetivo prevenir infecções de sítio cirúrgico, por meio da diminuição da carga microbiana no local da operação (COSTA; SANTA-CRUZ; FERRAZ, 2021). A escolha do antibiótico deve se basear no espectro de ação contra os patógenos mais comuns que causam ISC. Desse modo, as cefalosporinas são frequentemente os medicamentos de escolha, dado às suas propriedades amplamente estudadas, eficácia comprada e por possuir um baixo custo de aquisição (KHAN; KHAN, 2019).

A profilaxia antimicrobiana é um dos principais métodos de prevenção às Infecções de Sítio Cirúrgico, mas o enfrentamento a esse problema encontra dificuldades no tocante ao uso inadequado dos medicamentos antibióticos, que promove o surgimento de cepas bacterianas resistentes (TAN *et al.*, 2018). Portanto, um método promissor para a prevenção de ISC é o uso tópico direto de antimicrobianos na incisão cirúrgica, pela incorporação do agente antimicrobiano ao selante de fibrina.

Um estudo realizado por Gessmann *et al* avaliou a eficácia da incorporação de vancomicina, gentamicina e linezolida, em concentrações de 5-300 µg/mL, a um selante de fibrina e sua ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Esse estudo *in vitro* concluiu que a matriz de fibrina pode ser usada na administração local de certos antibióticos em um procedimento cirúrgico. Entre os três antibióticos testados, vancomicina e gentamicina se mostraram como candidatos mais úteis a essa finalidade (GESSMANN *et al.*, 2018). Ozaki *et al.* avaliou a matriz de fibrina como um sistema de liberação sustentada de vancomicina contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). Os resultados apontaram que a administração tópica de uma dose de 15 mg/mL de vancomicina incorporada a um selante de fibrina foi eficaz contra infecção localizada de enxerto de MRSA, sem administração sistêmica do antibiótico (OZAKI *et al.*, 2014). Em um estudo sobre a utilização de tetraciclina incorporada a uma matriz de fibrina para controle de infecção peritoneal por *Staphylococcus aureus*, Woolverton *et al.* avaliou que camundongos tratados profilaticamente com selante de fibrina + tetraciclina (500 mg/kg) apresentaram altos percentuais de sobrevivência, em comparação ao grupo controle. Concluiu-se que a fibrina é um excelente veículo para entrega prolongada de tetraciclina de baixa



solubilidade; tetraciclina proveniente da matriz de selante de fibrina é uma terapia adequada para peritonite provocada por *S. aureus*; selante de fibrina + tetraciclina controla a infecção localizada sem uma concentração mensurável de tetraciclina sistêmica (WOOLVERTON *et al.*, 2001). Frucht-Perry *et al.* estudou a eficácia da administração tópica de tobramicina (3,5 mg), adicionadas a mega lipossomas multivesiculares incorporados a um selante de fibrina, para a administração em córneas de coelho infectadas com *Pseudomonas aeruginosa*. O estudo concluiu que os mega lipossomas encapsulados com tobramicina podem servir como adjuvante útil no tratamento da ceratite causada por *Pseudomonas* (FRUCHT-PERRY *et al.*, 1992).

A administração tópica de antibióticos através dos selantes de fibrina pode ajudar a tratar infecções a nível local e reduzir o uso sistêmico de antibióticos potentes (OZAKI *et al.*, 2014). O interesse em pesquisas científicas para auxiliar na prevenção de infecções de sítio cirúrgico cresce substancialmente, na medida em que apresentam uma perspectiva de reduzir o custo atrelado a tecnologia de obtenção dos selantes de fibrina, que atualmente pode inviabilizar a utilização desse recurso terapêutico na prática médica (COSTA; SANTA-CRUZ; FERRAZ, 2021).

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA**

As bolsas de plasma utilizadas nesse trabalho foram fornecidas pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Plataforma Brasil, com CAAE – Certificação de Apresentação para Avaliação Ética – número: 57637516.7.0000.5208. Os pacientes não foram identificados e os dados do estudo foram analisados anonimamente. As bolsas fornecidas pelo hemocentro possuem sorologia negativa para HIV I/II hepatites B e C, sífilis, doença de chagas, HTLV I/II, conforme preconizado na Portaria Consolidada nº 5 do Ministério da Saúde, Art. 130 (BRASIL, 2017).

#### **3.2 OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE FIBRINOGENIO E TROMBINA PLASMÁTICOS PARA FORMULAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA**

##### **3.2.1 Obtenção do crioprecipitado**

Um total de quarenta bolsas de plasma, congeladas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  e armazenadas a  $-30^{\circ}\text{C}$ , foram descongeladas lentamente a  $-4^{\circ}\text{C}$ , durante 12 horas. Após essa etapa, as bolsas foram centrifugadas a 3500 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. O crioprecipitado contendo fibrinogênio foi recuperado pela separação do centrifugado e o sobrenadante foi utilizado nas etapas seguintes de precipitação de Euglobulinas plasmáticas.

##### **3.2.2 Dosagem de Fibrinogênio no crioprecipitado**

Os ensaios foram realizados em analisadores automatizados (ACL TOP®, Instrumentation Laboratory, Kirchheim, Alemanha), utilizando reagentes (HemosIL®, Instrumentation Laboratory) da mesma empresa. Foram utilizados lotes únicos de todos os reagentes. A concentração de fibrinogênio foi medida por meio de teste coagulométrico, tendo como controle validado, plasmas com concentração padronizada da proteína. Os ensaios quantitativos foram calibrados com plasma de

calibração (HemosIL®, Instrumentation Laboratory). Os experimentos foram realizados em duplicata. A análise estatística descritiva dos resultados foi feita utilizando o programa Excel®.

### **3.2.3 Precipitação das Euglobulinas plasmáticas**

O plasma sobrenadante do crioprecipitado (Plasma Isento de Crio – PIC) foi coletado e foram ajustadas as condições de precipitação das Euglobulinas plasmáticas (ALVES *et al.*, 2021). Em uma bolsa plástica de transferência, adicionou-se 100 mL do PIC, 400 mL de solução de glicose 5% (m/v) e 15 mL de HCl 1M, de modo que o pH atingisse o valor de 5.3, ponto isoelétrico das Euglobulinas. A bolsa foi centrifugada a 3500 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado contendo Euglobulinas foi recuperado e o sobrenadante descartado.

### **3.2.4 Avaliação qualitativa da atividade da Protrombina Plasmática utilizando a técnica do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)**

Essa etapa teve como objetivo avaliar, de forma qualitativa, a funcionalidade da Protrombina plasmática, contida no grupo das Euglobulinas. Inicialmente, os precipitados obtidos na etapa 3.2.3 foram ressuspensos com 10 mL de água destilada e amostras foram encaminhadas para testagem. O procedimento para a realização do teste de TTPa manual foi realizado de acordo com as instruções do kit WAMA DIAGNÓSTICA® - COAGULAÇÃO TTPa. O reagente Cloreto de Cálcio 0,02 M foi pré-incubado em banho-maria a 37°C. Pipetou-se 100 µL do plasma controle e das amostras proteicas em respectivos tubos de ensaio. Os tubos foram incubados em banho maria a 37°C. Após 2 minutos, foram adicionados em cada um dos tubos 100 µL do reagente TTPa e após 5 minutos de incubação, transferiu-se 100 µL do reagente Cloreto de Cálcio 0,02 M pré-incubado nos tubos de ensaio. O experimento foi realizado em duplicata.

### **3.2.5 Padronização da concentração de cálcio para conversão da protrombina em trombina**

O objetivo dessa etapa foi padronizar a fonte de cálcio para conversão da protrombina em trombina. Foram utilizadas soluções de sais de cálcio, em diferentes concentrações (Cloreto de Cálcio 0,02M; 0,2M; 2M; Carbonato de Cálcio 0,02M; 0,2M), para ressuspensão do precipitado obtido na etapa 3.2.3. A mistura de precipitado + solução de cálcio foi deixada em repouso por aproximadamente 60 minutos. O desempenho de cada agente de ressuspensão foi avaliado na etapa subsequente desse estudo (3.2.6), em que a capacidade coagulante do produto da reação do cálcio com a protrombina foi testada.

### **3.2.6 Teste de formação de coágulo de fibrina**

Foram adicionadas a um tubo de ensaio partes iguais (1:1) do produto obtido na etapa 3.2.5 e de crioprecipitado (item 3.2.1) para avaliação da formação de um coágulo de fibrina. O tempo de coagulação foi registrado.

### **3.2.7 Determinação da concentração da solução contendo Trombina Humana**

Para determinar a concentração de trombina purificada neste trabalho, foi utilizado o método de Clauss invertido (SEMPLE *et al.*, 2005), em que uma fonte de fibrinogênio de concentração conhecida (plasma) é adicionada à amostra de trombina a ser testada, e então o tempo de coagulação é medido. Inicialmente foi feita uma curva de calibração, em que a trombina padrão, de concentração 100 UI/mL, foi diluída em água destilada nas proporções: 1, 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20. Para a realização da técnica, a amostra de plasma padrão foi diluída em 1:10 (0,1 mL de plasma e 0,9 mL de tampão Imidazol 50 mmol/L, Azida Sódica 0,05%) e então 0,2 mL dele foi incubado em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Para cada ponto da curva, adicionou-se 0,1 mL das diferentes diluições de trombina padrão e o cronômetro foi simultaneamente disparado. Foram registrados os tempos de formação de coágulo. O gráfico da curva de calibração foi feito no programa Excel®, aplicando os valores de concentração de trombina no eixo X e os tempos de coagulação no eixo Y (Figura 8).

Para realizar a dosagem da trombina purificada no presente trabalho, as amostras foram diluídas na proporção 1:5 e a concentração foi estabelecida com base na curva de calibração obtida. O experimento foi realizado em duplicata. A análise estatística descritiva dos resultados foi feita utilizando o programa Excel®.

### 3.3 INCORPORAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS À SOLUÇÃO DE TROMBINA E TESTE DE FORMAÇÃO DE COÁGULO

Para esse ensaio foram utilizados cloridrato de vancomicina 50 mg/mL e sulfato de gentamicina 40 mg/mL. Cada agente antimicrobiano foi adicionado a um tubo de ensaio contendo solução de trombina, nas proporções de 1:10; 1:20 e 1:40, como indicado na Tabela 1.

Tabela 1 – Adição de cloridrato de vancomicina 50 mg/mL e sulfato de gentamicina 40 mg/mL a amostras de solução de trombina, nas proporções 1:10; 1:20; 1:40, para realização do teste de formação de coágulo

<b>Diluição</b>	<b>Volume do agente antimicrobiano*</b>	<b>Volume de solução trombina</b>
1:10	500 µL	4,5 mL
1:20	250 µL	4,75 mL
1:40	125 µL	4,875 mL
tubo controle	-	5 mL

\*cloridrato de vancomicina ou sulfato de gentamicina

Fonte: A autora (2022).

As soluções de trombina enriquecidas com antibiótico, bem como a amostra controle, foram misturadas a 5 mL de crioprecipitado (proporção 1:1), para um novo teste de formação de coágulo. O tempo de coagulação foi verificado, bem como as características macroscópicas dos coágulos de fibrina formados. O experimento foi realizado em triplicata.

### 3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS A MATRIZ DE FIBRINA FRENTE À ESPÉCIE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

#### 3.4.1 Preparo do inóculo

A partir de uma cultura estoque de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), uma alíquota do microrganismo foi inoculada nas seguintes condições: meio de cultura caldo *brain-heart infusion* (BHI); temperatura de incubação de 35°C; por 24 horas. Após a incubação, realizou-se uma centrifugação, após a qual o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido com solução salina estéril, de modo a se obter uma concentração final de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. A concentração final do microrganismo foi confirmada por um teste turbidimétrico (escala McFarland).

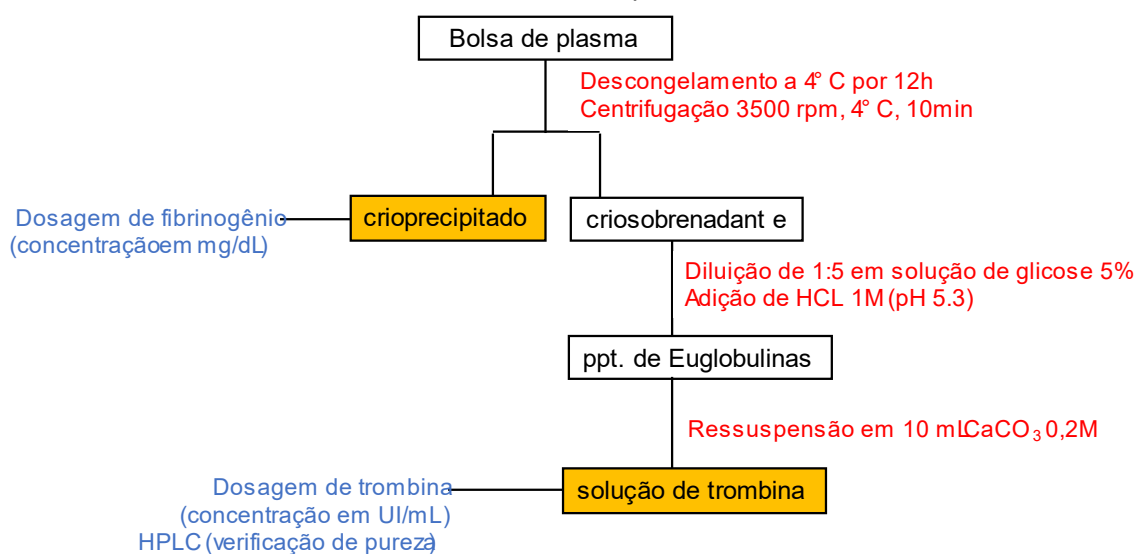
#### 3.4.2 Ensaio microbiológico

O ensaio microbiológico foi realizado pelo método automatizado de hemocultura BACTEC™ FX. Foram adicionados aos recipientes próprios do sistema BACTEC™ FX: 5mL da solução de trombina acrescida enriquecida com antibiótico (5 mL de trombina sem antibiótico para controle positivo); 50 µL de suspensão bacteriana e 5mL de crioprecipitado. Após a formação do coágulo de fibrina, os recipientes foram incubados no BACTEC™ FX por um total de 72 horas. A presença ou não de *Staphylococcus aureus* foi avaliada após 6, 12, 24, 48 e 72 horas de incubação frente às diferentes preparações de matriz de fibrina contendo antimicrobianos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 4 resume a técnica, desenvolvida no presente estudo, de obtenção de fibrinogênio e trombina para a formulação de um selante de fibrina autólogo em hemocentros.

Figura 4 – Fluxograma da técnica de obtenção de fibrinogênio e trombina humanos a partir de uma única unidade de plasma



Fonte: A autora (2022).

### 4.1 OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE FIBRINOGENIO E TROMBINA PLASMÁTICOS PARA FORMULAÇÃO DO SELANTE DE FIBRINA

A partir dos crioprecipitado e sobrenadante obtidos a partir do descongelamento das 40 bolsas de plasma e posteriores centrifugações, realizou-se a dosagem do fibrinogênio e da trombina resultantes (Figura 5). O crioprecipitado formado foi imediatamente ressuspensionado em 15 mL de plasma, como preconizado pela Portaria Consolidada nº 5 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

Figura 5 – (A) 10 mL de solução contendo trombina humana / (B) fração proteica correspondente ao crioprecipitado (indicado pela seta), formada na bolsa de plasma sob temperatura de 4°C



Fonte: A autora (2022).

#### 4.1.1 Dosagem de Fibrinogênio no Crioprecipitado

O resultado das dosagens de fibrinogênio nas amostras de crioprecipitado está disposto nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Concentrações de fibrinogênio (mg/dL) nas amostras de crioprecipitado determinadas por ensaio coagulométrico automatizado

ID	Concentração (mg/dL) Duplicata		ID	Concentração (mg/dL) Duplicata		ID	Concentração (mg/dL) Duplicata		ID	Concentração (mg/dL) Duplicata	
CRIO nº 1	1175	1189	CRIO nº 11	1225	1197	CRIO nº 21	915	922	CRIO nº 31	1285	1288
CRIO nº 2	1995	1783	CRIO nº 12	240	252	CRIO nº 22	3010	2998	CRIO nº 32	2365	2357
CRIO nº 3	1860	1748	CRIO nº 13	770	783	CRIO nº 23	1005	1000	CRIO nº 33	3980	3974
CRIO nº 4	1385	1330	CRIO nº 14	1550	1555	CRIO nº 24	1195	1192	CRIO nº 34	3010	3002
CRIO nº 5	3450	3462	CRIO nº 15	1010	1004	CRIO nº 25	1225	1236	CRIO nº 35	2015	2011
CRIO nº 6	1925	1937	CRIO nº 16	665	673	CRIO nº 26	1460	1467	CRIO nº 36	1895	1899
CRIO nº 7	3340	3374	CRIO nº 17	875	881	CRIO nº 27	840	838	CRIO nº 37	755	763
CRIO nº 8	3810	3793	CRIO nº 18	600	612	CRIO nº 28	760	756	CRIO nº 38	830	821
CRIO nº 9	850	872	CRIO nº 19	2795	2803	CRIO nº 29	260	262	CRIO nº 39	960	988
CRIO nº 10	1190	1202	CRIO nº 20	1265	1271	CRIO nº 30	1550	1547	CRIO nº 40	1020	1024

ID: Identificação da amostra

Fonte: A autora (2022).



Tabela 3 – Análise estatística descritiva do resultado das dosagens de fibrinogênio em amostras de crioprecipitado

<b>Análise estatística descritiva</b>	<b>Resultados das dosagens de fibrinogênio</b>
Tamanho amostral (n)	40
Valor mínimo encontrado (concentração em mg/dL)	240
Valor máximo encontrado (concentração em mg/dL)	3980
Amplitude	3740
Média	1555
Desvio padrão	957,63

Fonte: A autora (2022).

Diferentes métodos podem ser usados para isolar o fibrinogênio do plasma sanguíneo, dentre eles a crioprecipitação, precipitação por etanol à frio, sulfato de amônio ou polietilenoglicol (DIETRICH *et al.*, 2013). De acordo com Noori *et al.*, a principal vantagem da crioprecipitação sobre as demais técnicas é que nenhum produto químico potencialmente citotóxico é necessário para o processo de obtenção de fibrinogênio, sendo, portanto, mais seguro e mais utilizado para a produção de selantes de fibrina industriais e autólogos (BURNOUNF, 2018; NOORI *et al.*, 2017). No entanto, Noori *et al.* destaca o fato da crioprecipitação ser um processo relativamente mais demorado, em comparação com os métodos químicos de purificação, além do rendimento final de fibrinogênio ser baixo (NOORI *et al.*, 2017).

De acordo com o indicado na Tabela 2, todas as amostras testadas apresentaram concentração de fibrinogênio acima de 150 mg/dL (valores apresentados em duplicata). Este representa o valor de referência preconizado na legislação brasileira como parâmetro de qualidade do crioprecipitado como hemocomponente utilizado na prática terapêutica (BRASIL, 2017). Este resultado vai de encontro ao observado por Noori *et al.*, em relação ao rendimento de fibrinogênio no CRIO.

A análise estatística descritiva do resultado das dosagens realizadas no CRIO (Tabela 3) revelou uma grande amplitude entre os valores mínimo e máximo de concentração de fibrinogênio das amostras analisadas, que pode ser explicada pela variação inerente à cada doador, que se encontra entre 3 e 30 g/L da proteína circulante no plasma sanguíneo (CALLUM *et al.*, 2019). A indústria farmacêutica de hemoderivados emprega, normalmente, a tecnologia de ultrafiltração para ajustar a

concentração do fibrinogênio oriundo do CRIO até uma concentração de cerca de 80 g/L (BURNOUNF, 2018). Esse ajuste de concentração é fundamental para que haja uma padronização dos Selantes de Fibrina fabricados. Todavia, a falta de um método acessível para a padronização da concentração de fibrinogênio no CRIO a nível laboratorial pode representar um desafio para a produção de Selantes de Fibrina autólogos nos hemocentros.

#### 4.1.2 Avaliação qualitativa da atividade da Protrombina Plasmática utilizando a técnica do Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa)

A Tabela 4 sintetiza o resultado da avaliação qualitativa da atividade da Protrombina obtida no presente trabalho a partir da precipitação das Euglobulinas Plasmáticas, enquanto a Figura 6 exibe alguns dos coágulos visualizados no experimento, nas amostras identificadas como PROT n°1, PROT n°15, PROT n° 24 e PROT n° 33.

Como é possível observar na Tabela 4, em todas as amostras analisadas foi identificada a presença de um coágulo, indicando que um concentrado de protrombina está, de fato, presente na massa precipitada e que após a adição de cloreto de cálcio, essa protrombina pôde ser convertida em trombina funcional, com capacidade de induzir a coagulação.

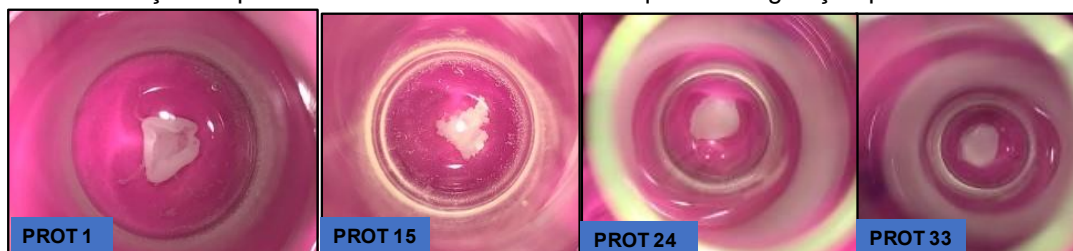
Tabela 4 – Resultado da avaliação qualitativa da atividade da Protrombina plasmática utilizando a técnica de TTPa para a promoção da coagulação

ID	Coagulação		ID	Coagulação		ID	Coagulação		ID	Coagulação	
PROT n° 1	+	+	PROT n° 11	+	+	PROT n° 21	+	+	PROT n° 31	+	+
PROT n° 2	+	+	PROT n° 12	+	+	PROT n° 22	+	+	PROT n° 32	+	+
PROT n° 3	+	+	PROT n° 13	+	+	PROT n° 23	+	+	PROT n° 33	+	+
PROT n° 4	+	+	PROT n° 14	+	+	PROT n° 24	+	+	PROT n° 34	+	+
PROT n° 5	+	+	PROT n° 15	+	+	PROT n° 25	+	+	PROT n° 35	+	+
PROT n° 6	+	+	PROT n° 16	+	+	PROT n° 26	+	+	PROT n° 36	+	+
PROT n° 7	+	+	PROT n° 17	+	+	PROT n° 27	+	+	PROT n° 37	+	+
PROT n° 8	+	+	PROT n° 18	+	+	PROT n° 28	+	+	PROT n° 38	+	+
PROT n° 9	+	+	PROT n° 19	+	+	PROT n° 29	+	+	PROT n° 39	+	+
PROT n° 10	+	+	PROT n° 20	+	+	PROT n° 30	+	+	PROT n° 40	+	+

ID: Identificação da amostra / +: Presença de coágulo.

Fonte: A autora (2022).

Figura 6 – Coágulos resultantes do teste de TTPa no fundo dos tubos de ensaio, indicando que houve ativação da protrombina em trombina e consequente coagulação plasmática.



Fonte: A autora (2022).

O Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (TTPa) foi utilizado como método de avaliação qualitativa da presença e atividade da protrombina por se tratar de um teste laboratorial baseado na determinação do tempo de coagulação do plasma citratado, após a adição dos reagentes que contém cefalina, ácido elágico e fosfolípidos (que atuam como substitutos das plaquetas) e cloreto de cálcio, desencadeando o mecanismo de coagulação da via intrínseca (PINHEIRO *et al.*, 2017).

Em recente publicação sobre a purificação de albumina plasmática a partir de uma única unidade de plasma e sua aplicação em ensaios *in vitro* com derivados de indol-tiazol e indol-tiazolidínicos, Alves e colaboradores desenvolveram uma técnica de precipitação que consistia em separar frações proteicas de alto peso molecular, por meio da diluição do plasma e alteração de pH, até se obter, na bolsa plástica de transferência, apenas uma solução de albumina humana em alta concentração (ALVES *et al.*, 2021). Uma das frações proteicas isoladas por Alves *et al.* consiste no grupo das Euglobulinas, insolúveis em pH 5.3 e que contêm a maior parte da protrombina circulante no plasma (HEDLIN; MONKHOUSE, 1969). No entanto, Alves *et al.* não chegou a avaliar, em seus estudos, se as proteínas precipitadas e separadas da albumina em solução possuíam sua atividade preservada após a adição dos agentes precipitantes. Os resultados obtidos nessa etapa do trabalho indicam que há preservação da atividade da protrombina após a diluição do plasma em solução de glicose e ajuste do pH em 5.3 utilizando HCl 1M.

#### 4.1.3 Padronização da concentração de cálcio para conversão da protrombina em trombina e Teste de formação de coágulo

A Tabela 5 detalha o tipo, concentração e volume dos agentes utilizados para ressuspensão do precipitado contendo Euglobulinas plasmáticas, bem como a massa (em gramas) de cada precipitado e o resultado do teste de formação de coágulo. A Figura 7 exhibe alguns dos coágulos visualizados no teste, nas amostras identificadas como PPT-e9, PPT-e12, PPT-e27.

Como evidenciado na Tabela 5, as soluções de cloreto de cálcio, nas concentrações de 0,02M; 0,2M e 2M não obtiveram sucesso em ativar coágulos de fibrina, podendo essas concentrações serem insuficientes para a conversão da protrombina precipitada em trombina ativa. O mesmo se deu com a solução de carbonato de cálcio 0,02M. No entanto, o carbonato de cálcio 0,2M mostrou-se eficaz para a finalidade pretendida.

Tabela 5 – Resultados dos testes de formação de coágulo após ressuspensão do precipitado de Euglobulinas com diferentes fontes de cálcio

Agente de ressuspensão	ID + massa do ppt (gramas)			Teste de formação de coágulo
Cloreto de Cálcio 0,02M 10 mL	PPT-a1 : 5,3g	PPT-a11 : 5,1g	PPT-a21 : 5,0g	Não houve formação de coágulo
	PPT-a2 : 5,0g	PPT-a12 : 5,3g	PPT-a22 : 6,0g	
	PPT-a3 : 6,2g	PPT-a13 : 5,0g	PPT-a23 : 6,1g	
	PPT-a4 : 5,8g	PPT-a14 : 6,0g	PPT-a24 : 6,1g	
	PPT-a5 : 5,6g	PPT-a15 : 6,1g	PPT-a25 : 5,1g	
	PPT-a6 : 6,1g	PPT-a16 : 6,0g	PPT-a26 : 5,1g	
	PPT-a7 : 5,3g	PPT-a17 : 5,2g	PPT-a27 : 5,2g	
	PPT-a8 : 5,1g	PPT-a18 : 5,3g	PPT-a28 : 5,7g	
	PPT-a9 : 5,1g	PPT-a19 : 5,0g	PPT-a29 : 5,7g	
	PPT-a10 : 5,1g	PPT-a20 : 5,0g	PPT-a30 : 5,5g	
Cloreto de Cálcio 0,2M 10 mL	PPT-b1 : 5,1g	PPT-b11 : 5,2g	PPT-b21 : 4,8g	Não houve formação de coágulo
	PPT-b2 : 5,0g	PPT-b12 : 5,2g	PPT-b22 : 4,8g	
	PPT-b3 : 5,2g	PPT-b13 : 6,0g	PPT-b23 : 4,1g	
	PPT-b4 : 5,8g	PPT-b14 : 6,0g	PPT-b24 : 5,1g	
	PPT-b5 : 5,8g	PPT-b15 : 6,3g	PPT-b25 : 5,9g	
	PPT-b6 : 6,4g	PPT-b16 : 6,3g	PPT-b26 : 5,9g	
	PPT-b7 : 6,4g	PPT-b17 : 5,3g	PPT-b27 : 5,9g	
	PPT-b8 : 6,4g	PPT-b18 : 5,4g	PPT-b28 : 5,5g	
	PPT-b9 : 5,5g	PPT-b19 : 5,7g	PPT-b29 : 5,5g	
	PPT-b10 : 5,5g	PPT-b20 : 5,0g	PPT-b30 : 5,5g	
	PPT-c1 : 5,0g	PPT-c11 : 5,2g	PPT-c21 : 6,2g	

Cloreto de Cálcio 2M 10 mL	PPT-c2 : 5,0g	PPT-c12 : 5,2g	PPT-c22 : 6,1g	Não houve formação de coágulo
	PPT-c3 : 6,7g	PPT-c13 : 5,2g	PPT-c23 : 4,4g	
	PPT-c4 : 4,8g	PPT-c14 : 5,2g	PPT-c24 : 6,0g	
	PPT-c5 : 5,6g	PPT-c15 : 6,4g	PPT-c25 : 5,7g	
	PPT-c6 : 6,6g	PPT-c16 : 6,3g	PPT-c26 : 4,2g	
	PPT-c7 : 5,6g	PPT-c17 : 5,9g	PPT-c27 : 4,2g	
	PPT-c8 : 5,9g	PPT-c18 : 5,9g	PPT-c28 : 4,7g	
	PPT-c9 : 5,9g	PPT-c19 : 5,0g	PPT-c29 : 6,7g	
	PPT-c10 : 5,6g	PPT-c20 : 5,0g	PPT-c30 : 5,5g	
	PPT-d1 : 5,8g	PPT-d11 : 4,1g	PPT-d21 : 4,9g	
	PPT-d2 : 5,8g	PPT-d12 : 4,3g	PPT-d22 : 4,8g	
	PPT-d3 : 6,7g	PPT-d13 : 5,8g	PPT-d23 : 6,2g	
Carbonato de Cálcio 0,02M 10 mL	PPT-d4 : 6,7g	PPT-d14 : 6,6g	PPT-d24 : 6,2g	Não houve formação de coágulo
	PPT-d5 : 5,4g	PPT-d15 : 6,6g	PPT-d25 : 5,9g	
	PPT-d6 : 6,1g	PPT-d16 : 6,0g	PPT-d26 : 5,1g	
	PPT-d7 : 5,0g	PPT-d17 : 5,2g	PPT-d27 : 5,9g	
	PPT-d8 : 5,0g	PPT-d18 : 5,1g	PPT-d28 : 5,7g	
	PPT-d9 : 5,4g	PPT-d19 : 5,8g	PPT-d29 : 5,3g	
	PPT-d10 : 5g	PPT-d20 : 5,8g	PPT-d30 : 5,3g	
	PPT-e1 : 5,6g	PPT-e11 : 6,1g	PPT-e21 : 6,5g	
	PPT-e2 : 5,7g	PPT-e12 : 6,3g	PPT-e22 : 6,4g	
	PPT-e3 : 4,8g	PPT-e13 : 5,9g	PPT-e23 : 6,5g	
Carbonato de Cálcio 0,2M 10mL	PPT-e4 : 4,7g	PPT-e14 : 4,6g	PPT-e24 : 6,5g	Houve formação de coágulo
	PPT-e5 : 5,9g	PPT-e15 : 4,6g	PPT-e25 : 5,2g	
	PPT-e6 : 5,8g	PPT-e16 : 5,0g	PPT-e26 : 5,2g	
	PPT-e7 : 5,0g	PPT-e17 : 6,2g	PPT-e27 : 4,9g	
	PPT-e8 : 6,2g	PPT-e18 : 6,3g	PPT-e28 : 4,7g	
	PPT-e9 : 6,2g	PPT-e19 : 6,3g	PPT-e29 : 5,4g	
	PPT-e10 : 6,0g	PPT-e20 : 6,5g	PPT-e30 : 5,9g	

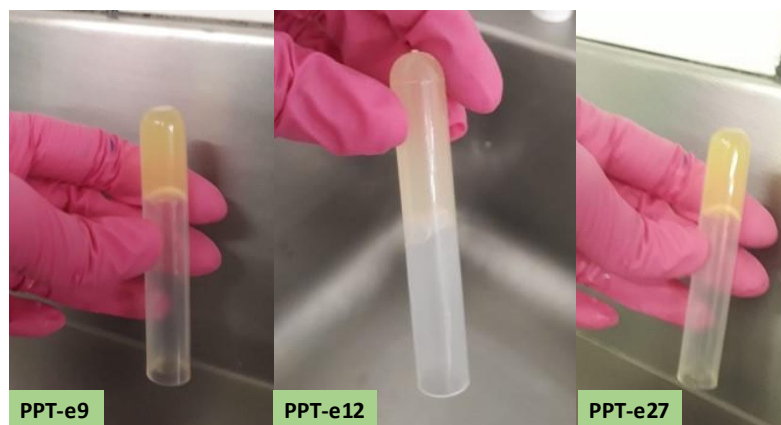
ID: Identificação da amostra / ppt: precipitado  
Fonte: A autora (2022).

No Teste de Formação de Coágulos, o processo de coagulação se deu instantaneamente, a partir do momento em que foram misturados a trombina, ativada com carbonato de cálcio 0,2M e o crioprecipitado rico em fibrinogênio, em todo o conteúdo do tubo. Os coágulos formados ficaram fortemente aderidos às paredes do tubo de ensaio, como se pode visualizar na Figura 7.

É possível que a concentração de cálcio necessária para ativação de trombina esteja, no caso da metodologia desenvolvida nesse trabalho, diretamente relacionada à quantidade de protrombina contida na massa precipitada de Euglobulinas a ser ressuspendida. Nesse sentido, a dosagem da concentração da trombina, realizada na etapa subsequente desse estudo, foi de fundamental importância para a elucidação

das razões pelas quais concentrações de carbonato de cálcio inferiores a 0,2M não foram suficientes para ativação da trombina e consequente formação de coágulo.

Figura 7 – Coágulos de fibrina fortemente aderidos ao fundo dos tubos de ensaio após mistura de solução de trombina e crioprecipitado rico em fibrinogênio



Fonte: A autora (2022).

O cloreto de cálcio costuma ser o ativador de coágulo mais comumente utilizado no preparo dos selantes de fibrina (GESSMANN *et al.*, 2018; ROCK *et al.*, 2007; SEMPLE *et al.*, 2005) e em ensaios laboratoriais de coagulação (DE MAGALHÃES; MORATO, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Outros sais contendo cálcio também podem promover a conversão de protrombina em trombina, como o carbonato de cálcio (BURNOUNF, 2018). Menos corriqueiramente sais de outra natureza são usados com esse objetivo, como é o caso do método desenvolvido por Aizawa, Winge e Karlsson (2008), em que citrato de sódio 950 mM é incubado em pH 8, por 48 horas, a 44°C, com uma fração de plasma rica em protrombina (AIZAWA; WINGE; KARLSSON, 2008).

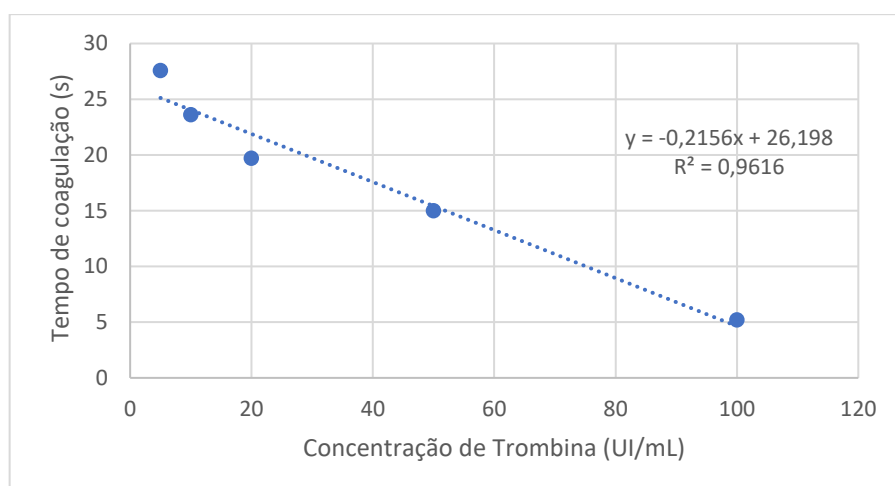
Na rotina laboratorial, a concentração dos reagentes de cloreto de cálcio é indicada no rótulo do produto e comumente é igual a 0,02M. Na produção de selantes de fibrinas, por sua vez, a concentração desses agentes pode variar, a depender do método utilizado para ativação da Trombina. Semple *et al.*, em uma análise da qualidade da trombina purificada, a partir de uma doação autóloga de plasma humano, por um dispositivo de purificação de trombina (*Thrombin-Processing Device®*), utilizou 7,2 mM de cloreto de cálcio, juntamente com etanol 19% (v/v) para ativação da enzima (SEMPLE *et al.*, 2005). Em um estudo similar feito por Rock e colaboradores, dois anos mais tarde, foi adicionada a mesma concentração do sal de cálcio, agora com uma concentração final de etanol igual a 10% (v/v) (ROCK *et al.*, 2007). Hanson e

Quinn preparam o coágulo de fibrina, para a investigação da quimiotaxia de neutrófilos, com cloreto de cálcio 30 mM (HANSON; QUINN, 2002). Gessmann *et al.*, em um artigo publicado em 2018, utilizou uma solução de cloreto de cálcio 10% (m/v) para a ativação de trombina e formação de um coágulo de fibrina, sendo que a concentração final de cálcio foi equivalente a 2,5% do volume total de plasma (GESSMANN *et al.*, 2018).

#### 4.1.4 Determinação da concentração da solução contendo Trombina Humana

A curva de calibração para dosagem de trombina pelo método de Clauss invertido é demonstrada na Figura 8 e Tabela 6. A equação da reta obtida foi  $Y = -0,2156X + 26,198$  com um  $R^2 = 0,9616$ .

Figura 8 – Curva de calibração obtida pelo método de Clauss invertido para dosagem de trombina



Fonte: A autora (2022).

Tabela 6 – Obtenção de diferentes concentrações conhecidas de trombina padrão e tempo de coagulação para a elaboração da curva de calibração

Concentração da trombina padrão (UI/mL)	Diluição	Tempo de coagulação duplicata (segundos)		Tempo de coagulação média (segundos)
100	-	5,53	4,87	5,20
50	1:2	17,56	12,44	15,00
20	1:5	18,30	21,12	19,71
10	1:10	24,65	22,57	23,61
5	1:20	27,82	27,34	27,58

Fonte: A autora (2022).

A Tabela 7 exhibe os valores das concentrações das amostras de trombina, calculados com base na equação da reta obtida por meio da curva de calibração e na multiplicação do resultado encontrado pelo fator de diluição das amostras, enquanto a Tabela 8 traz uma análise estatística descritiva dos resultados.

Todas as soluções de trombina coletadas como produto da ressuspensão do precipitado de euglobulinas com uma fonte de cálcio para conversão da protrombina continham um volume final igual a 10 mL.

A análise estatística descritiva do resultado das dosagens de concentração das amostras de trombina (Tabela 8) indica uma grande amplitude entre os valores mínimo e máximo das concentrações em UI/mL. Essa amplitude é inerente a variação fisiológica de cada indivíduo doador de plasma. As concentrações finais de trombina são superiores às encontradas em outros artigos que descrevem métodos de produção de selantes de fibrina autólogos (KUMAR; CHAPMAN, 2007; ROCK *et al.*, 2007; SEMPLE *et al.*, 2005). As concentrações média e modal (388,66 e 482,32, respectivamente) também foram maiores do que a da trombina purificada por Aizawa, Winge e Karlsson (238 UI/mL), que utilizou técnicas de produção e purificação industriais de larga escala (AIZAWA; WINGE; KARLSSON, 2008).

Tabela 7 – Resultado da determinação da concentração das soluções de trombina humana por meio da metodologia de Clauss invertida

ID	Tempo de coagulação (s) (média)*	Conc. Final** (UI/mL)	ID	Tempo de coagulação (s) (média)*	Conc. Final** (UI/mL)
TRB-01	14,24	277,31	TRB-61	13,05	304,80
TRB-02	19,30	159,97	TRB-62	7,66	429,91
TRB-03	14,68	267,11	TRB-63	5,72	474,79
TRB-04	20,12	140,95	TRB-64	8,02	421,45
TRB-05	14,08	281,02	TRB-65	18,73	173,07
TRB-06	10,40	366,37	TRB-66	6,10	466,09
TRB-07	16,79	218,18	TRB-67	9,03	398,02
TRB-08	11,70	336,22	TRB-68	5,37	483,02
TRB-09	5,40	482,32	TRB-69	7,77	427,36
TRB-10	5,20	486,96	TRB-70	7,89	424,46
TRB-11	6,60	454,49	TRB-71	5,47	480,58
TRB-12	5,60	477,69	TRB-72	7,75	427,82
TRB-13	10,12	372,75	TRB-73	11,31	345,26
TRB-14	13,40	296,68	TRB-74	4,96	492,53
TRB-15	6,50	456,81	TRB-75	11,24	346,77
TRB-16	9,01	398,49	TRB-76	16,80	217,94
TRB-17	10,63	360,92	TRB-77	5,95	469,57
TRB-18	15,26	253,54	TRB-78	5,03	490,90
TRB-19	20,46	133,07	TRB-79	18,72	173,42
TRB-20	18,79	171,68	TRB-80	5,65	476,53



TRB-21	6,90	447,54	TRB-81	6,49	456,93
TRB-22	5,62	477,22	TRB-82	9,17	394,78
TRB-23	5,50	480,00	TRB-83	5,75	474,09
TRB-24	8,12	419,24	TRB-84	6,89	447,65
TRB-25	16,51	224,67	TRB-85	7,08	443,36
TRB-26	7,74	427,94	TRB-86	5,40	482,32
TRB-27	10,23	370,19	TRB-87	12,07	327,52
TRB-28	5,07	489,86	TRB-88	10,16	371,82
TRB-29	5,75	474,09	TRB-89	19,20	162,29
TRB-30	7,15	441,74	TRB-90	9,64	383,99
TRB-31	7,81	426,43	TRB-91	5,20	486,96
TRB-32	13,67	290,53	TRB-92	6,82	449,39
TRB-33	13,96	283,81	TRB-93	8,90	401,15
TRB-34	7,32	437,80	TRB-94	6,81	449,62
TRB-35	11,92	331,00	TRB-95	12,16	325,55
TRB-36	6,64	453,45	TRB-96	10,36	367,18
TRB-37	5,57	478,26	TRB-97	19,40	157,53
TRB-38	10,97	353,03	TRB-98	16,15	233,02
TRB-39	16,17	232,44	TRB-99	5,75	474,09
TRB-40	18,44	179,80	TRB-100	6,65	453,33
TRB-41	13,02	305,49	TRB-101	8,02	421,45
TRB-42	9,74	381,67	TRB-102	10,06	374,25
TRB-43	6,20	463,77	TRB-103	5,50	479,89
TRB-44	11,97	329,84	TRB-104	7,25	439,42
TRB-45	6,31	461,22	TRB-105	6,78	450,20
TRB-46	7,27	438,96	TRB-106	11,96	330,19
TRB-47	4,99	491,72	TRB-107	5,04	490,56
TRB-48	13,86	286,13	TRB-108	5,40	482,32
TRB-49	8,02	421,45	TRB-109	7,62	430,72
TRB-50	9,87	378,54	TRB-110	9,87	378,54
TRB-51	4,83	495,43	TRB-111	5,56	478,61
TRB-52	7,93	423,53	TRB-112	5,40	482,32
TRB-53	4,99	491,72	TRB-113	4,96	492,53
TRB-54	6,03	467,60	TRB-114	16,97	213,89
TRB-55	9,16	395,01	TRB-115	6,12	465,51
TRB-56	12,17	325,32	TRB-116	11,33	344,80
TRB-57	5,58	478,03	TRB-117	7,16	441,51
TRB-58	5,26	485,45	TRB-118	9,45	388,40
TRB-59	9,16	395,01	TRB-119	8,20	417,39
TRB-60	5,40	482,32	TRB-120	6,36	459,94

ID: Identificação da amostra / s: segundos / Conc.: Concentração / \*Média da duplicata

\*Valor multiplicado pelo fator de diluição da amostra (fator de diluição = 5)

Fonte: A autora (2022).

Tabela 8 – Análise estatística descritiva do resultado das dosagens de concentração de trombina

<b>Análise estatística descritiva</b>	<b>Resultado das dosagens de concentração de trombina</b>
Tamanho amostral (n)	120
Concentração média (UI/mL)	388,66
Desvio padrão	98,72
Mediana	423,99
Moda	482,32
Intervalo	362,36
Concentração mínima (UI/mL)	133,07
Concentração máxima (UI/mL)	495,43

Fonte: A autora (2022).

O Quadro 4 faz um comparativo entre a trombina purificada nesse trabalho, identificada como TRB-L, e a de outros pesquisadores; bem como entre soluções de trombina componentes de selantes de fibrina comercializados no Brasil.

É possível estimar, com base nos custos dos reagentes e insumos utilizados na produção da TRB-L, que o valor médio necessário para produção de 1mL do selante é de cerca de R\$ 0,20 (vinte centavos de real). Esse valor é substancialmente inferior àquele necessário para a aquisição dos selantes de fibrina industriais por órgãos de saúde pública, através de pregões (Quadro 4). O fator econômico, nesse caso, poderia representar uma vantagem na utilização dessa metodologia para obtenção de selantes de fibrina em hemocentros brasileiros.

Quadro 4 – Comparativo entre a TRB-L e diferentes trombinas de origem humana purificadas para utilização em selantes de fibrina segundo fabricante, origem, concentração e preço

<b>Preço médio por mL</b>	R\$ 0,20	-	-	-	-	R\$ 795,00**	R\$ 824,50**	R\$ 750,00**
<b>Concentração de trombina (UI/mL)</b>	388,66 ± 98,72	51,8 ± 12,4	64,3 ± 16,7	60	238	500	800-1200	400-600

Produto	Desenvolvedor	Natureza do Selante de Fibrina
	TRB-L*	Autóloga
Trombina humana	Simple <i>et al</i> (2005)	Autóloga
Trombina humana	Rock <i>et al</i> (2007)	Autóloga
Trombina humana (TPD system)	Kumar, Chapman (2007)	Autóloga
Trombina humana	Aizawa, Winge, Karlsson (2008)	Heteróloga
TISSEEL®	Baxter Healthcare	Heteróloga
EVICEL®	OMRIX Biopharmaceuticals	Heteróloga
BERIPLAST®	CSL Behring	Heteróloga

TRB-L \*: Trombina obtida através da metodologia desenvolvida no presente trabalho

\*\*valores médios baseados em pregões públicos realizados desde 2020 (Fonte: portaldecomprasaude.gov.br). Fonte: A autora (2022).

#### 4.2 INCORPORAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS À SOLUÇÃO DE TROMBINA E TESTE DE FORMAÇÃO DE COÁGULO

Todos os coágulos de fibrina foram formados instantaneamente, independentemente do tipo e do volume de antibiótico adicionado à solução de trombina. Em contrapartida, observou-se que os coágulos contendo gentamicina e vancomicina apresentaram menores consistência e adesão à parede do tubo, quando comparados ao controle, de maneira inversamente proporcional ao volume de antibiótico adicionado ao sistema (Figura 9). Entre os coágulos contendo cloridrato de vancomicina e sulfato de gentamicina não foram observadas diferenças significativas a olho nu (Figura 10).

A diferença nas características dos coágulos de fibrina acrescidos de antibiótico pode ser explicada pelo fato de que afinidades de ligação entre diferentes antibióticos e uma matriz de fibrina levam a alterações conformacionais na estrutura do coágulo, como a espessura, porosidade e diâmetro da malha de fibrina; sua permeabilidade e consequente capacidade de retenção e liberação de substâncias (GESSMANN *et al.*,

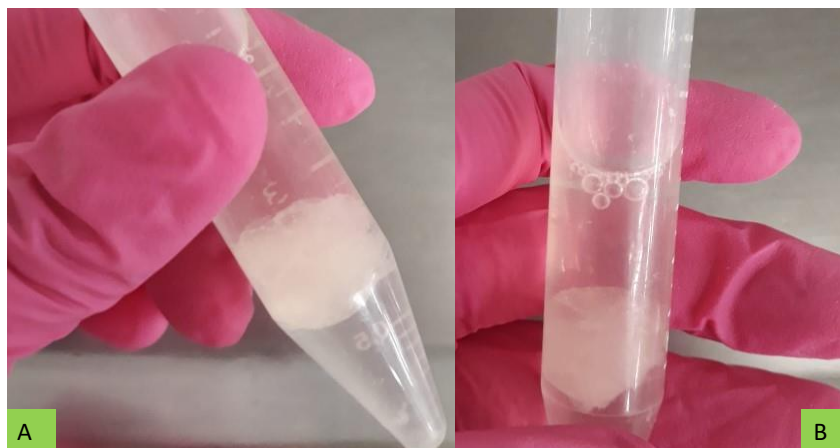
2018). Uma análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) poderia ser útil para o estudo desse fenômeno de forma mais aprofundada e uma maior caracterização dessa matriz de fibrina

Figura 9 – (A) Tubo controle / (B) Coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de cloridrato de vancomicina na proporção de 1:40/ (C) Coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de cloridrato de vancomicina na proporção de 1:10



Fonte: A autora (2022).

Figura 10 – (A) Coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de sulfato de gentamicina na proporção de 1:10 / (B) Coágulo formado a partir de solução de trombina acrescida de cloridrato de vancomicina na proporção de 1:10



Fonte: A autora (2022).

### 4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS INCORPORADOS A MATRIZ DE FIBRINA FRENTE A ESPÉCIE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ambos os agentes antimicrobianos adicionados a matriz de fibrina foram capazes de inibir a contaminação por *Staphylococcus aureus* por até 72 horas, em todas as proporções ANTIBIÓTICO:TROMBINA testadas (Quadros 5 e 6).

Quadro 5 – Resultado qualitativo do ensaio microbiológico automatizado BACTEC™ FX para a atividade de cloridrato de vancomicina 50 mg/dL incorporado a matriz de fibrina frente a espécie *Staphylococcus aureus*

Diluição antibiótico trombina	Cloridrato de vancomicina 50 mg/dL				
	1:10	-	-	-	-
	1:20	-	-	-	-
	1:40	-	-	-	-
		6	12	24	72
Tempo de incubação (horas)					
Controle positivo		+	+	+	+

(+): resultado positivo para presença bacteriana / (-): resultado negativo para presença bacteriana.

Fonte: A autora (2022).

Quadro 6 – Resultado qualitativo do ensaio microbiológico automatizado BACTEC™ FX para a atividade de sulfato de gentamicina 40 mg/dL incorporado a matriz de fibrina frente a espécie *Staphylococcus aureus*

Diluição antibiótico trombina	Sulfato de gentamicina 40 mg/dL				
	1:10	-	-	-	-
	1:20	-	-	-	-
	1:40	-	-	-	-
		6	12	24	72
Tempo de incubação (horas)					
Controle positivo		+	+	+	+

(+): resultado positivo para presença bacteriana / (-): resultado negativo para presença bacteriana.

Fonte: A autora (2022).

Esses resultados sugerem que a utilização deste selante de fibrina, fabricado a nível de hemocentro, pode ser eficaz na prevenção de infecções por *Staphylococcus aureus*, uma das principais espécies causadoras das ISC.

Mais estudos são necessários para confirmar a ação satisfatória desse hemoderivado enriquecido de agente antimicrobiano para a prevenção das ISC, como a repetição do teste com outros microrganismos causadores de infecções de sítio cirúrgico, além de ensaios *in vivo*.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível concluir que a metodologia desenvolvida nessa pesquisa se mostrou eficaz para a obtenção de um selante de fibrina de natureza autóloga, tendo como princípio a utilização de uma única unidade de plasma para obtenção de uma fonte de fibrinogênio (crioprecipitado) e de protrombina, convertida em trombina por meio de carbonato de cálcio 0,2M.

Essa nova técnica mostra-se uma alternativa promissora e econômica para a produção, em escala laboratorial, de selantes de fibrina autólogos em hemocentros brasileiros; apesar da dificuldade de padronização da concentração das proteínas componentes desse hemoderivado representar um desafio para sua formulação.

Com a incorporação de cloridrato de vancomicina e sulfato de gentamicina ao selante de fibrina e consequente inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, é possível estimar também que esse produto hemoderivado seja capaz de prevenir Infecções de Sítio Cirúrgico (ISC). Mais estudos são necessários para avaliar a eficácia da ação de agentes antimicrobianos incorporados no selante frente as demais espécies causadoras das ISC.

O desenvolvimento de uma metodologia simples e de baixo custo para obtenção de uma matriz de fibrina possui relevância, para além da prática clínica e cirúrgica, nas mais diversas áreas de pesquisa e inovação terapêutica; dado a versatilidade desse material biológico e a perspectiva de sua utilização em ramos da tecnologia farmacêutica e medicina regenerativa, tendo em vista o potencial da matriz de fibrina de servir como base para a incorporação de diversos fármacos (*drug delivery*) e células humanas.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, E.; FATIMA, M. T.; HOQUE, M.; OWAIS, M.; SALEEMUDDIN, M. Fibrin matrices: The versatile therapeutic delivery systems (a review). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 121-136, 2015.
- AIZAWA, P.; WINGE, S.; KARLSSON, G. Large-scale preparation of thrombin from human plasma. **Thrombosis Research**, v. 122, n. 4, p. 560-567, 2008.
- ALVES, J. E. F. *et al.* A simple method for obtaining human albumin and its use for in vitro interaction assays with indole-thiazole and indole-thiazolidinone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, n. 1, p. 126-137, 2021.
- ANDERSSON, R.; SØREIDE, K.; ANSARI, D. Surgical infections and antibiotic stewardship: In need for new directions. **Scandinavian Journal of Surgery**, v. 110, n. 1, p. 110-112, 2019.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 6ª Ed. Brasília, 2019.
- BANIASADI, S.; ALAEEN, Z.; SHADMEHR, M. B. Surgical antibiotic prophylaxis: a descriptive study among thoracic surgeons. **Tanaffos**, v. 15, n. 3, p. 154-159, 2016.
- BERTOLINI, J.; GOSS, N.; CURLING, J. **Production of plasma proteins for therapeutic use**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 137/2019**, de 30 de março de 2022. Brasília, 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria de Consolidação nº 5**, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. 2017a. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/marco/29/PRC-5-Portaria-de-Consolida----o-n---5--de-28-de-setembro-de-2017.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Guia para uso de hemocomponentes**. 2ª ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
- BREEN, A. M.; DOCKERY, P.; O'BRIEN, T.; PANDIT, A. S. The use of therapeutic gene eNOS delivered via a fibrin scaffold enhances wound healing in a compromised wound model. **Biomaterials**, v. 29, n. 21, p. 3143-3151, 2008.
- BROWN, A. C.; BARKER, T. H. Fibrin-based biomaterials: modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 4, p. 1502-1514, 2014.

BUJOLI, B.; SCIMECA, J.C; VERRON, E. Fibrin as a multipurpose physiological platform for bone tissue engineering and targeted delivery of bioactive compounds. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 556, 2019.

BURNOUF, T.; SU, C. Y.; RADOSEVICH, M.; GOUBRAN, H.; EL-EKIABY, M. Blood-derived biomaterials: fibrin sealant, platelet gel and platelet fibrin glue. **ISBT Science Series**, v. 4, n. 1, p. 136-142, 2009.

BURNOUF, T.; BARRO, L.; NEBIE, O.; WU, Y. W.; GOUBRAN, H.; KNUTSON, F.; SEGATCHIANG, J. Viral safety of human platelet lysate for cell therapy and regenerative medicine: moving forward, yes, but without forgetting the past. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 58, n. 6, p. 102674, 2019.

BURNOUF, T. An overview of plasma fractionation. **Annals of Blood**, v. 3, p. 33, 2018.

BUTERA, D.; HOGG, P. J. Fibrinogen function achieved through multiple covalent states. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

CASHMAN, J. D. ; JACKSON, J. K.; MUGABE, C.; GILCHRIST, S.; BURT, H. M.; BALL, K.; TREDWELL, S. The use of tissue sealants to deliver antibiotics to an orthopaedic surgical site with a titanium implant. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 18, n. 1, p. 165-174, 2013.

CALLUM, J.; FARKOUH, M. E.; SCALES, D. C. *et al.* Effect of fibrinogen concentrate vs cryoprecipitate on blood component transfusion after cardiac surgery: the FIBRES randomized clinical trial. **JAMA**, v. 322, n. 20, p. 1966-1976, 2019.

CHENNA, D.; SHASTRY, S.; DAS, S. Cocktail protocol for preparation of platelet-rich fibrin glue for autologous use. **The Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 35-40, 2021

CHERNYSH, I. N.; EVERBACH, C. E.; PUROHIT, P. K.; WEISEL, J. W. Molecular mechanisms of the effect of ultrasound on the fibrinolysis of clots. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. 4, p. 601-609, 2015.

CHIU, C. L.; HECHT, V.; DUONG, H.; WU, B.; TAWIL, B. Permeability of three-dimensional fibrin constructs corresponds to fibrinogen and thrombin concentrations. **BioResearch Open Access**, v. 1, n. 1, p. 34-40, 2012.

CHOUDHURY, S.; DUTTA, A.; GUPTA, N.; PAL, D. K. Interposing layer of fibrin glue: A new horizon in vesico-vaginal fistula repair. **Urologia Journal**, p. 03915603211004748, 2021.

CHRISTMAN, K. L.; FANG, Q.; YEE, M. S.; JOHNSON, K. R.; SIEVERS, R. E.; LEE, R. J. Enhanced neovasculature formation in ischemic myocardium following delivery of pleiotrophin plasmid in a biopolymer. **Biomaterials**, v. 26, n. 10, p. 1139-1144, 2005.



COHN, E. J., *et al.* Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids<sup>1a,b,c,d</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 68, n. 3, p. 459-475, 1946.

COSKUN, H.; YARDIMCI, E. Effects and results of fibrin sealant use in 1000 laparoscopic sleeve gastrectomy cases. **Surgical Endoscopy**, v. 31, n. 5, p. 2174-2179, 2017.

COSTA, A. C. da; SANTA-CRUZ, F.; FERRAZ, A. A. B. O que há de novo em infecção do sítio cirúrgico e antibioticoprofilaxia em cirurgia? **ABCD - Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva** (São Paulo), v. 33, n. 4, e1558, 2021.

COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

DAUD, A.; KAUR, B.; MCCLURE, G. R.; BELLEY-COTE, E. P.; HARLOCK, J.; CROWTHER, M.; WHITLOCK, R. P. Fibrin and thrombin sealants in vascular and cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 60, n. 3, p. 469-478, 2020.

DE MAGALHAES, A. V. P.; MORATO, C. B. A. Avaliação do uso de anticoncepcional oral combinado como fator de risco para o desenvolvimento de trombose em mulheres jovens da cidade de Patos. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-PERNAMBUCO**, v. 4, n. 1, p. 77-77, 2018.

DE MELO, B. A. G.; JODAT, Y. A.; CRUZ, E. M.; BENINCASA, J. C.; SHIN, S. R.; PORCIONATTO, M. A. Strategies to use fibrinogen as bioink for 3D bioprinting fibrin-based soft and hard tissues. **Acta Biomaterialia**, v. 117, p. 60-76, 2020.

DE OLIVEIRA, M. A. M.; SOUZA, I. B. de; SILVA, J. A.; RIBEIRO, C. H. M. A.; PRETE, A. C. L. Comparação dos perfis inflamatório e trombótico de pacientes com COVID-19 em seus diferentes desfechos: alta hospitalar e óbito. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, e34311225990-e34311225990, 2022.

DI CERA, E. Thrombin. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 29, n. 4, p. 203-254, 2008.

DIETRICH, M.; HESELHAUS, J.; WOZNIAK, J.; WEINANDY, S.; MELA, P.; TSCHOEKE, B.; SCHMITZ-RODE, T.; JOCKENHOEVEL, S. Fibrin-based tissue engineering: comparison of different methods of autologous fibrinogen isolation. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 19, n. 3, p. 216-226, 2013.

DOMBROVSKAYA, Y. A. *et al.* Fibrin scaffolds containing dental pulp stem cells for the repair of periodontal bone defects. **Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 59-69, 2020.

FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 7ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2019.

FRUCHT-PERRY, J.; ASSIL, K. K.; ZIEGLER, E.; DOUGLAS, H.; BROWN, S. I.; SCHANZLIN, D. J.; WEINREB, R. N. Fibrin-enmeshed tobramycin liposomes: single application topical therapy of *Pseudomonas keratitis*. **Cornea**, v. 11, n. 5, p. 393-397, 1992.

GAULE, T. G.; AJJAN, R. A. Fibrin(ogen) as a therapeutic target: opportunities and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6916, 2021.

GEER, D. J.; SWARTZ, D. D.; ANDREADIS, S. T. Biomimetic delivery of keratinocyte growth factor upon cellular demand for accelerated wound healing in vitro and in vivo. **The American Journal of Pathology**, v. 167, n. 6, p. 1575-1586, 2005.

GESSMANN, J.; SEYBOLD, D.; AYAMI, F.; PETER, E.; BAECKER, H.; SCHILDHAUER, T. A.; KÖLLER, M. Peripheral blood plasma clot as a local antimicrobial drug delivery matrix. **Tissue Engineering Part A**, v. 24, n. 9-10, p. 809-818, 2018.

GWAK, S. J.; KIM, S. S.; SUNG, K.; HAN, J.; CHOI, C. Y.; KIM, B. S. Synergistic effect of keratinocyte transplantation and epidermal growth factor delivery on epidermal regeneration. **Cell Transplantation**, v. 14, n. 10, p. 809-817, 2005.

HANSON, A. J.; QUINN, M. T. Effect of fibrin sealant composition on human neutrophil chemotaxis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 61, n. 3, p. 474-481, 2002.

HEDLIN, A. M.; MONKHOUSE, F. C. Fibrinolytic activities of euglobulins precipitated at pH 6.4, 6.0, and 5.3. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 47, n. 11, p. 935-940, 1969.

HEHER, P.; MÜHLEDER, S.; MITTERMAYR, R.; REDL, H.; SLEZAK, P. Fibrin-based delivery strategies for acute and chronic wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 129, p. 134-147, 2018a.

HEHER, P.; FERGUSON, J.; REDL, H.; SLEZAK, P. An overview of surgical sealant devices: current approaches and future trends. **Expert Review of Medical Devices**, v. 15, n. 10, p. 747-755, 2018b.

ITO, K.; YAMADA, Y.; NAIKI, T.; UEDA, M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 5, p. 579-586, 2006.

JENKINS, D. R.; CRANER, M. J.; ESIRI, M. M.; DELUCA, G. C. Contribution of fibrinogen to inflammation and neuronal density in human traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 35, n. 19, p. 2259-2271, 2018.

JEON, O.; RYU, S. H.; CHUNG, J. H.; KIM, B. S. Control of basic fibroblast growth factor release from fibrin gel with heparin and concentrations of fibrinogen and thrombin. **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 3, p. 249-259, 2005.

KAHLER, U.; KAMENIK, A. S.; KRAML, J.; LIEDL, K. R. Sodium-induced population shift drives activation of thrombin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1086, 2020.

KHAN, Z.; KHAN, F. U. Surgical antimicrobial prophylaxis and adherence to standard treatment guidelines: urgent need of antimicrobial stewardship program. **Journal of Research in Pharmacy Practice**, v. 8, n. 4, p. 225-226, 2019.

KUMAR, V.; CHAPMAN, J. R. Whole blood thrombin: development of a process for intra-operative production of human thrombin. **The Journal of Extra-Corporeal Technology**, v. 39, n. 1, p. 18, 2007.

LOPEZCARASA-HERNANDEZ, G.; PEREZ-VASQUEZ, J. F.; GUERRERO-NARANJO, J. F.; MARTINEZ-CASTELLANOS, M. A. Versatility of use of fibrin glue in wound closure and vitreo-retinal surgery. **International Journal of Retina and Vitreous**, v. 7, n. 33, p. 1-5, 2021.

MEDMARKET DILIGENCE. **Worldwide Markets for Medical and Surgical Sealants, Glues, and Hemostats, 2015-2022**: Established and Emerging Products, Technologies and Markets in the Americas, Europe, Asia/Pacific and Rest of World. Report #S290, 2016.

MICHLITS, W.; MITTERMAYR, R.; SCHÄFER, R.; REDL, H.; AHARINEJAD, S. Fibrin-embedded administration of VEGF plasmid enhances skin flap survival. **Wound Repair and Regeneration**, v. 15, n. 3, p. 360-367, 2007.

MIRON, R. J.; ZHANG, Y. Autologous liquid platelet rich fibrin: A novel drug delivery system. **Acta Biomaterialia**, v. 75, p. 35-51, 2018.

MITTERMAYR, R.; MORTON, T.; HOFMANN, M.; HELGERSON, S.; VAN GRIENSVEN, M.; REDL, H. Sustained (rh) VEGF165 release from a sprayed fibrin biomatrix induces angiogenesis, up-regulation of endogenous VEGF-R2, and reduces ischemic flap necrosis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 4, p. 542-550, 2008.

NOORI, A.; ASHRAFI, S. J.; VAEZ-GHAEMI, R.; HATAMIAN-ZAREMI, A.; WEBSTER, T. J. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 4937-4961, 2017.

ORLANDINI, B.; SCHEPIS, T.; TRINGALI, A.; FAMILIARI, P.; BOŠKOSKI, I.; ANDREIS, F. B. DE; PERRI, V.; COSTAMAGNA, G. Fibrin glue injection: Rescue treatment for refractory post-sphincterotomy and post-papillectomy bleedings. **Digestive Endoscopy**, v. 33, n. 5, p. 815-821, 2021.

OZAKI, S.; SAITO, A.; NAKAMINAMI, H.; ONO, M.; NOGUCHI, N.; MOTOMURA, N. Comprehensive evaluation of fibrin glue as a local drug-delivery system - efficacy and safety of sustained release of vancomycin by fibrin glue against local methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Artificial Organs**, v. 17, n. 1, p. 42-49, 2014.

PANDIT, A. S.; FELDMAN, D. S.; CAULFIELD, J.; THOMPSON, A. Stimulation of angiogenesis by FGF-1 delivered through a modified fibrin scaffold. **Growth Factors**, v. 15, n. 2, p. 113-123, 1998.

PELC, L. A.; KOESTER, S. K.; KUKLA, C. R.; CHEN, Z.; DI CERA, E. The active site region plays a critical role in Na<sup>+</sup> binding to thrombin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 1, p. 101458, 2022.

PIETERS, M.; WOLBERG, A. S. Fibrinogen and fibrin: An illustrated review. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 2, p. 161-172, 2019.

PINHEIRO, Y. T.; SILVA, E. C. L. da; MACIEL, M. A.; SOUSA, E. T. de. Hemofilias e Doença de von Willebrand: uma revisão de literatura. **Archives of Health Investigation**, v. 6, n. 5, 2017.

RAJANGAM, T.; AN, S. S. A. Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 3641-3662, 2013.

RANG, H. P. **Farmacologia**. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.

RODRIGUEZ-MERCHAN, E. C. Fibrin glue for local haemostasis in haemophilia surgery. **Hospital Practice**, v. 45, n. 5, p. 187-191, 2017.

RUBALSKII, E.; *et al.* Fibrin glue as a local drug-delivery system for bacteriophage PA5. **Scientific Reports**, v. 9, n. 2091, 2019.

SCHEK, R. M.; HOLLISTER, S. J.; KREBSBACH, P. H. Delivery and protection of adenoviruses using biocompatible hydrogels for localized gene therapy. **Molecular Therapy**, v. 9, n. 1, p. 130-138, 2004.

SEMPLE, E.; MADSEN, T.; SEMPLE, J. W. Quality of thrombin produced from the patient's own plasma using the TPD™, a new thrombin-processing device. **The Journal of Extra-Corporeal Technology**, v. 37, n. 2, p. 196, 2005.

SPOTNITZ, W. D. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. **World Journal of Surgery**, v. 34, n. 4, p. 632-634, 2010.

SPOTNITZ, W. D. History of tissue adhesives. *In*: **Surgical adhesives and sealants**. CRC Press, 2020. P. 3-11.

SU, Y. Y.; LIN, Y. S.; YANG, L. Y.; PAN, Y. B.; HUANG, Y. T.; WENG, C. H.; WU, K. Y.; WANG, C. J. Use of human fibrin glue (Tisseel) versus suture during transvaginal natural orifice ovarian cystectomy of benign and non-endometriotic ovarian tumor: a retrospective comparative study. **BMC Surgery**, v. 21, n. 49, p. 1-8, 2021.

SUBBIAH, R.; GULDBERG, R. E. Materials science and design principles of growth factor delivery systems in tissue engineering and regenerative medicine. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 1, p. 1801000, 2019.

SUR, S.; RATHORE, A.; DAVE, V.; REDDY, K. R.; CHOUHAN, R. S.; SADHU, V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. **Nano-Structures & Nano-Objects**, v. 20, p. 100397, 2019.

TAN, R. K.; LEE, H. S.; MA, H.; LEE, H. W.; HAN, S. K. Antibacterial effect of antibiotic-saturated fibrin sealant; *in vitro* study. **Journal of Wound Management and Research**, v. 14, n. 1, p. 12-17, 2018.

VAN QUILL, K. R.; DIOGUARDI, P. K.; TONG, C. T.; GILBERT, J. A.; AABERG JUNIOR, T. M.; GROSSNIKLAUS, H. E.; EDELHAUSER, H. F.; O'BRIEN, J. M. Subconjunctival carboplatin in fibrin sealant in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. **Ophthalmology**, v. 112, n. 6, p. 1151-1158, 2005.

WAGHULE, T.; SINGHVI, G.; DUBEY, S. K.; PANDEY, M.; GUPTA, G.; SINGH, M.; DUA, K. Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1249-1258, 2019.

WOOLVERTON, C. J.; HUEBERT, K.; BURKHART, B.; MACPHEE, M. Subverting bacterial resistance using high dose, low solubility antibiotics in fibrin. **Infection**, v. 27, n. 1, p. 28-33, 1999.

WOOLVERTON, C. J.; FULTON, J. A.; SALSTROM, S. J.; HAYSLIP, J.; HALLER, N. A.; WILDROUDT, M. L.; MACPHEE, M. Tetracycline delivery from fibrin controls peritoneal infection without measurable systemic antibiotic. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 861-867, 2001.

XIAO, J. **Understanding generalized allostery in thrombin**. Tese de Doutorado. Wake Forest University, Winston-Salem, Carolina do Norte, 2018.

YTHIER, J. M. The contested market of plasma. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 27, n. 1, p. 52-57, 2020.

ZHANG, Y. Applications of fibrin tissue sealant. *In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing, 2021. p. 052098.