

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ISABELA CHITOLINA SCHETINGER

**PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO ANTIFÚNGICOS:
A BUSCA POR UM CURATIVO BIOATIVO**

Porto Alegre

2019

ISABELA CHITOLINA SCHETINGER

**PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS CONTENDO ANTIFÚNGICOS:
A BUSCA POR UM CURATIVO BIOATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do grau de
Bacharel em Biotecnologia, com ênfase em
Biotecnologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo Pasquali

Co-orientadora: Dra. Fernanda Cortez Lopes

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria Rosa, por ser meu eterno exemplo de cientista e de mulher, por sempre incentivar minha curiosidade e acreditar nos meus sonhos, e por fornecer todo apoio e recursos para que eu chegasse até aqui;

A minha segunda mãe, Eliara, por todo o carinho, apoio e cuidado de uma vida inteira;

As minhas irmãs, Christina e Luísa, por sempre tornarem perto o (muito) longe, por me darem força, inspiração, (muito) amor e sempre acreditarem que eu era capaz;

Aos meus amigos, Áxil, Laura, Natália e Julia, por serem a família que eu ganhei, pelas risadas, apoio, sofrimento coletivo e pelas doses de comida e motivação diárias;

A todos os amigos que encontrei no Cientista Beta, por me ensinarem o que é ciência, por me mostrarem como ter esperança no futuro (e até no presente);

A minha namorada, Luyza, por me compreender e me motivar, pelos cafés (e colos) nas madrugadas, por sempre me lembrar de dar um passo de cada vez (e por dar eles comigo), por ser a melhor companheira de vida que eu poderia ter;

A minha psicóloga, Lisiane e **a minha psiquiatra**, Vanessa, por sempre acreditarem em mim, me ampararem, e me fazerem enxergar caminho por caminho, até aqui;

A minha co-orientadora, Fernanda, por ser uma professora incansável e uma grande amiga, por toda a paciência e disposição ao me ensinar qualquer coisa por mais simples que fosse, por sempre checar se a porta do lab estava fechada 5x junto comigo, e por me mostrar a profissional e cientista que um dia eu espero ser;

Ao meu orientador, Professor Giancarlo, por permitir que eu realizasse esse trabalho sob sua orientação e por me fornecer todo o aporte e incentivo para tal;

Ao Professor Douglas Gamba, ao Professor Guido Lenz e à Luiza Cherobini, por todo o auxílio para que esse trabalho pudesse ser concretizado;

As minhas colegas de laboratório Ana, Anne, Juliana, Jozi e às Fernandas, por todos os ensinamentos, risadas, desabafos e convivência diária, da qual já sinto falta;

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos (os muitos) que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Muito obrigada!

RESUMO

Monitorar ferimentos tópicos e protagonizar o bloqueio e o tratamento de possíveis patógenos e infecções recorrentes em uma lesão é um desafio que tem aliado médicos e pesquisadores pelo mundo todo. Buscar alternativas curativas que supram as necessidades do paciente ao mesmo tempo que sejam acessíveis, eficientes, práticas e biocompatíveis é uma temática cada vez mais estudada e aplicada nos tratamentos modernos. Esse trabalho objetiva essa busca: a produção de um hidrogel bioativo como matriz curativa, formulado com duas moléculas antifúngicas. A primeira, Jaburetox, é um peptídeo recombinante com atividade antifúngica descrita na literatura em 2012; e a segunda: cetoconazol, um fármaco antifúngico amplamente utilizado desde a década de 1970. Realizando primeiramente uma análise bibliográfica aprofundada sobre os termos-chave deste trabalho, em uma plataforma referência (PubMed), observamos que esses temas de estudo, além de cada vez mais pesquisados, apresentam uma carência na literatura quando se observa as suas inter-conexões. Ou seja, não há nenhuma publicação sobre a formulação de hidrogéis com Jaburetox (Jbtx) e poucas formulando cetoconazol nesse tipo matriz. Compreendendo a necessidade de dados mais robustos sobre as propriedades antifúngicas dessas duas moléculas em uma formulação de hidrogel, realizamos a produção desses hidrogéis e análises quantitativas sobre a capacidade antifúngica de Jbtx (em quatro diferentes concentrações) e de cetoconazol (em três diferentes doses) pelo método *Drop plate* em *Candida albicans*. Observamos que tanto os hidrogéis formulados com Jbtx quanto com cetoconazol apresentaram uma atividade antifúngica estatisticamente significativa nas menores concentrações testadas (8,25 μ M para Jbtx e na dose de 10 μ g para cetoconazol). Porém, essa atividade não se manteve estável dentre todas as replicatas biológicas, principalmente para o Jbtx, que apresentou diferentes resultados dependendo do tempo de estocagem dos hidrogéis. Além disso, realizou-se um teste de citotoxicidade em queratinócitos humanos para aferir a biocompatibilidade dos hidrogéis formulados com cetoconazol, cujos resultados demonstraram certo grau de citotoxicidade. Dessa forma, apesar de observarmos alguns resultados positivos quanto à atividade antifúngica de Jbtx e cetoconazol em hidrogéis, há a necessidade de mais estudos sobre o tema avaliando diferentes formulações de

hidrogéis. Dessa maneira, poderemos encontrar o que de fato buscamos: aliar o potencial antifúngico desses hidrogéis à biocompatibilidade necessária para utilizá-los como curativos bioativos.

Termos-chave: hidrogel, curativo bioativo, biomaterial, Jaburetox, antifúngico, cetoconazol.

ABSTRACT

Monitoring topical wounds and playing a lead role in the blockade and treatment of possible pathogens and recurrent infections of an injury is a challenge that has allied physicians and researchers all around the world. Seeking healing alternatives that meet the patient's needs while being accessible, efficient, practical and biocompatible is an increasingly studied and applied theme in modern treatments. This project aims towards this search: the production of a bioactive hydrogel as a curative matrix, formulated with two antifungal molecules. The first one, Jaburetox, is a recombinant peptide with its antifungal activity described in literature in 2012; and the second: ketoconazole, a widely used commercial antifungal since the 1970s. We started by conducting an in-depth bibliographical analysis of the key terms of this work in a reference platform (PubMed). By doing so, we observed that these themes of study, besides being increasingly researched, yet present a lack in literature when observing their inter-connections. That is, there are no publications about the formulation of hydrogels containing Jaburetox (Jbtx) and few formulating ketoconazole in this kind of matrix. Understanding the need for more robust data on the antifungal properties of these two molecules in a hydrogel formulation, we performed the production of these hydrogels and quantitative analyzes on the antifungal capacity of Jbtx (at four different concentrations) and ketoconazole (at three different doses) by using the Drop Plate method in *Candida albicans*. Both hydrogels formulated with Jbtx and ketoconazole showed a statistically significant antifungal activity at the lowest concentrations tested (8.25 μ M for Jbtx and at dose 10 μ g for ketoconazole). However, this activity was not stable among all biological replicates, especially for Jbtx, which presented different results depending on the hydrogels stocking time. In addition, a cytotoxicity test using human keratinocytes aiming to test biocompatibility was performed on the hydrogels formulated with ketoconazole, which results showed certain level of cytotoxicity. Thus, although we observed some positive results regarding the antifungal activity of Jbtx and ketoconazole, there is a need for further studies on the subject evaluating different formulations of hydrogels. By doing so, we will be able to find what we are truly looking for: combine the antifungal potential of

these hydrogels with the necessary biocompatibility to use them as bioactive wound dressings.

Key terms: hydrogel, bioactive wound dressing, biomaterial, Jaburetox, antifungal, ketoconazole.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA: Análise de Variância

APS: Persulfato de Amônio

BSA: Soro Fetal Bovino

°C: Graus Celsius

cm: Centímetro

DMEM: Meio de Eagle modificado da Dulbecco, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DO: Densidade Ótica, do inglês, *Optical Density (OD)*

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético, do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*

g: Grama

h: Hora

HaCaT: Cultura de queratinócitos humanos

Jbtx: Jaburetox

JBU: Urease de feijão-de-porco, do inglês, *jack-bean urease*

JBURE-II: Urease de feijão-de-porco II

L: Litro

LB: Meio Luria Bertani

m: Metro

μ: Micro

μg: Micrograma

μM: Micromolar

M: Molar

mg: Miligrama

min: Minutos

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio, do inglês, *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*

nm: Nanômetro

p: Probabilidade de Significância

PBS: Tampão fosfato salino

PEGm: Polietilenoglicol-metacrilado

pH: Potencial de Hidrogênio, do inglês, *potential of Hydrogen*

rpm: Rotações por minuto

TCEP: Tris(2-carboxietil)fosfina, do inglês, *tris(2-carboxyethyl)phosphine*

TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

UV: Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de cura de um ferimento.....	15
Figura 2 – Respostas imuno-fisiológicas em cada estágio de cura de um ferimento crônico.....	17
Figura 3 – Ilustração das propriedades de um curativo ideal.....	18
Figura 4 – Ilustração de um curativo bioativo.....	19
Figura 5 – Representação do curativo <i>Vigilon</i>	25
Figura 6 – Publicações sobre o uso de hidrogéis como curativos.....	26
Figura 7 – Ilustração de um curativo inteligente com matriz de hidrogel formulada com fármaco.....	27
Figura 8 – Estrutura química da molécula de cetoconazol.....	30
Figura 9 – Representação do método <i>Drop Plate</i>	36
Figura 10 – Estimativa de publicações sobre curativos.....	38
Figura 11 – Estimativa de publicações sobre hidrogéis.....	39
Figura 12 – Estimativa de publicações sobre hidrogéis com aplicações diversas.....	41
Figura 13 – Estimativa de publicações sobre antifúngicos.....	42
Figura 14 – Estimativa de publicações sobre cetoconazol.....	43
Figura 15 – Código de cores das legendas dos resultados.....	44
Figura 16 – Atividade antifúngica de Jaburetox.....	45
Figura 17 – Atividade antifúngica comparativa entre hidrogéis polimerizados com TEMED ou com Bissulfito de potássio.....	47
Figura 18 – Atividade antifúngica de Jaburetox após diálise.....	48
Figura 19 – Atividade antifúngica de cetoconazol submetido à esterilização por UV.....	49
Figura 20 – Atividade antifúngica de cetoconazol e Jaburetox.....	50
Figura 21 – Atividade antifúngica de cetoconazol.....	51
Figura 22 – Viabilidade de <i>C. albicans</i> em hidrogéis contendo cetoconazol.....	52
Figura 23 – Atividade antifúngica qualitativa de cetoconazol.....	53
Figura 24 – Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de materiais curativos e suas respectivas taxas de utilização mundial em 2017.....	20
Tabela 2 – Tabela 2. Propriedades biológicas ureólise-independentes de selecionadas ureases e peptídeos derivados de ureases.....	28

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ABREVIACÕES.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 CURATIVOS.....	14
1.2 CURATIVOS BIOATIVOS.....	18
1.3 HIDROGÉIS.....	23
1.4 UREASES E JABURETOX.....	27
1.5 CETOCONAZOL.....	30
1.6 JUSTIFICATIVA.....	31
1.7 OBJETIVOS.....	32
1.7.1 Objetivo Geral.....	32
1.7.2 Objetivos específicos.....	32
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
2.1 ANÁLISE BIBLIOGRÁFICA.....	34
2.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE JABURETOX.....	34
2.3 PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS.....	35
2.4 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	36
2.5 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	37
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	38
3.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	44
3.2.1 Atividade Antifúngica Quantitativa em <i>C. albicans</i>	44
3.2.2 Atividade Antifúngica Qualitativa em <i>C. albicans</i>	52

3.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	54
4 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	56
5 REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Curativos

Danos à pele são algumas das lesões corporais mais comuns ao longo de toda história da humanidade (ZHAO *et al.*, 2017). Um ferimento é definido como uma interrupção na continuidade do revestimento epitelial da pele ou mucosa, resultando em um dano físico ou/e térmico (FRANZ *et al.*, 2001). De acordo com a duração e natureza do desenvolvimento da cura, o ferimento é caracterizado como agudo ou crônico. Os ferimentos agudos (Figura 1) são aqueles que demoram de dias a algumas semanas para percorrer as diferentes fases do processo de cura e atingir o estágio de remodelamento da epiderme. O ferimento crônico (Figura 2), por sua vez, pode demorar de meses a anos para atingir esse estado de remodelamento. Segundo (BROWN; ASHLEY; KOH, 2018), pode-se distinguir os seguintes estágios para o processo de reparo de um ferimento: a hemostase e a inflamação, em que ao mesmo tempo que nas primeiras horas há a formação de um coágulo, há a presença de células do sistema imune (como macrófagos, neutrófilos e leucócitos), vermelhidão e possibilidade de aumento de temperatura e inchaço na superfície ferida; a proliferação, em que os fibroblastos começam a recobrir a camada antes lesada e diminuir a área ferida exposta; e por último, o remodelamento: em que a derme e a epiderme foram completamente recobertas e observa-se só cicatrizes superficiais. A duração desses estágios e a eficiência da resposta imuno-fisiológica em cada estado está sujeita aos processos de assepsia e tratamento, assim como à escolha do curativo adequado para que o ferimento seja isolado, sem efeitos danosos ao processo de reparo, como hipóxia.

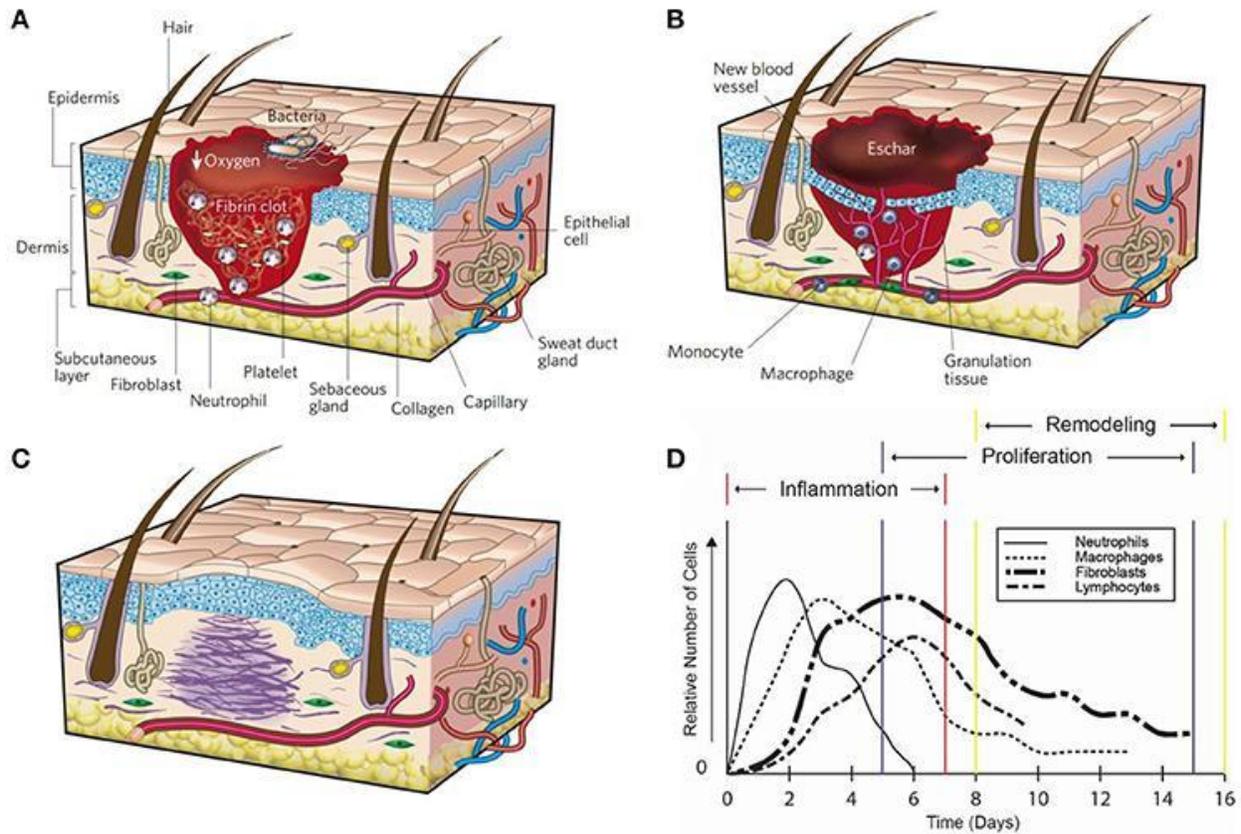


Figura 1. Processo de cura de um ferimento. Os três estágios de reparo: **(A)** inflamação, **(B)** proliferação, e **(C)** remodelamento (WONG; GURTNER, 2012). **(D)** O período de tempo da migração celular de células imunes durante o processo de cura nos primeiros 15 dias (WITTE; BARBUL, 1997). Fonte: reutilizada por (BROWN; ASHLEY; KOH, 2018).

A cura de um ferimento é um processo dinâmico e complexo que requer um ambiente compatível para promover sua máxima eficiência. Ela é o resultado de interações entre citocinas, fatores de crescimento, sangue e matriz extracelular (Figura 2). As citocinas promovem a cura através de diversas vias: estimulam a produção de componentes da membrana basal, prevenindo desidratação, aumentando a inflamação e a formação do tecido de granulação (ENOCH *et al.*, 2006). Quando o ferimento está fechado com o curativo, ele está promovendo uma locomoção orientada ao longo de um gradiente químico, como a absorção de exsudatos, por exemplo. Essa propriedade o torna permissivo para a troca passiva de fluidos, e continuamente exposto a proteinases e fatores de crescimento, que são majoritariamente perdidos quando o ferimento está

exposto. Assim, durante o século XX, a produção de curativos chamados de oclusivos (fechados) começou a promover um ambiente úmido e seletivo para o ferimento. Esses curativos corroboram uma reconstrução epitelial mais rápida, favorecem a síntese de colágeno, e estimulam a angiogênese quando há hipóxia (ainda que permitindo a oxigenação seletiva do ferimento); resultando em uma diminuição na possibilidade de infecção do ferimento (SARABAHÍ *et al.*, 2012). Com os avanços da tecnologia, mais de três mil produtos já foram desenvolvidos para tratar diferentes tipos de ferimentos, tendo como alvo vários aspectos desse processo de recuperação (DHIVYA; VIJAYA; SANTHINI, 2015). O crescimento gradativo do interesse e de publicações em curativos cada vez mais inovadores disponibiliza que gozemos hoje dos mais diversos tipos de materiais curativos para quase todos os tipos de ferimentos (Tabela 1). Assim, gerar alternativas biotecnológicas para desenvolver materiais que amenizem quaisquer tipos de lesões tópicas e diminuam o tempo médio de recuperação completa do tecido lesado, o qual pode durar de meses a anos (Figura 2), tornou-se um dos grandes desafios da engenharia de tecidos e da medicina modernas. Uma dessas alternativas, hoje já acessíveis, são curativos que não são apenas oclusivos, mantendo o ferimento em condições controladas, mas também oculares: pela sua transparência, pode-se monitorar a evolução do processo de cura. Um exemplo de curativo oclusivo e ocular são os hidrogéis, hoje já disponíveis em diversas formulações e métodos de aplicação (NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018).

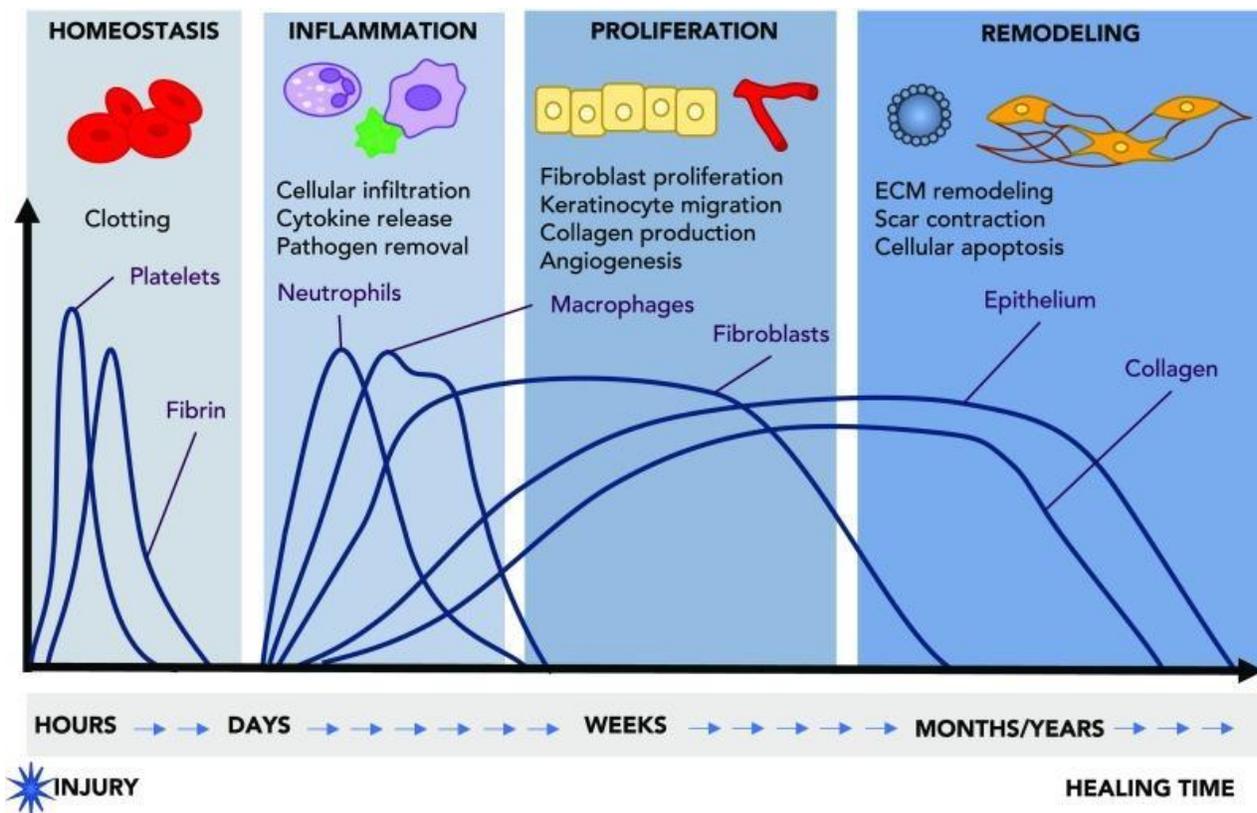


Figura 2. Respostas imuno-fisiológicas em cada estágio de cura de um ferimento crônico. Em ferimentos crônicos, as fases de proliferação e de remodelação podem durar de semanas a anos. Fonte: (MANDLA; HUYER; RADISIC, 2018)

A seleção do material do curativo para um ferimento em particular é importante para atingir uma cura acelerada, ao mesmo tempo que resolutive. Um sistema curativo é composto primordialmente de dois elementos: a matriz do curativo, produzida para estar em contato com o ferimento; e as bandagens, responsáveis por manter a estabilidade física do curativo sob a superfície do ferimento. Há uma preocupação crescente sobre o uso de materiais cada vez mais inteligentes como curativos, já que esses são responsáveis por serem alguns dos principais fatores externos durante o processo de cura de ferimentos (UZUN, 2018). Segundo UZUN, algumas características requeridas para um curativo ser classificado idealmente como inteligente são: bioadesividade seletiva, ou seja, a capacidade de adesão daquele material à superfície do ferimento, sem que haja dano ou dor na sua eventual remoção; a facilidade de aplicação e esterilização; a inibição de contaminações por micro-organismos; a

biodegradabilidade; a permeabilidade ao oxigênio, também classificado como a capacidade de oxigenação do curativo; a não-toxicidade, dentre outras características ideais dependendo do tipo de curativo. Para atingir essa gama extensa de requisitos desejáveis (Figura 3), os curativos modernos têm as mais diversas formulações (Tabela 1).

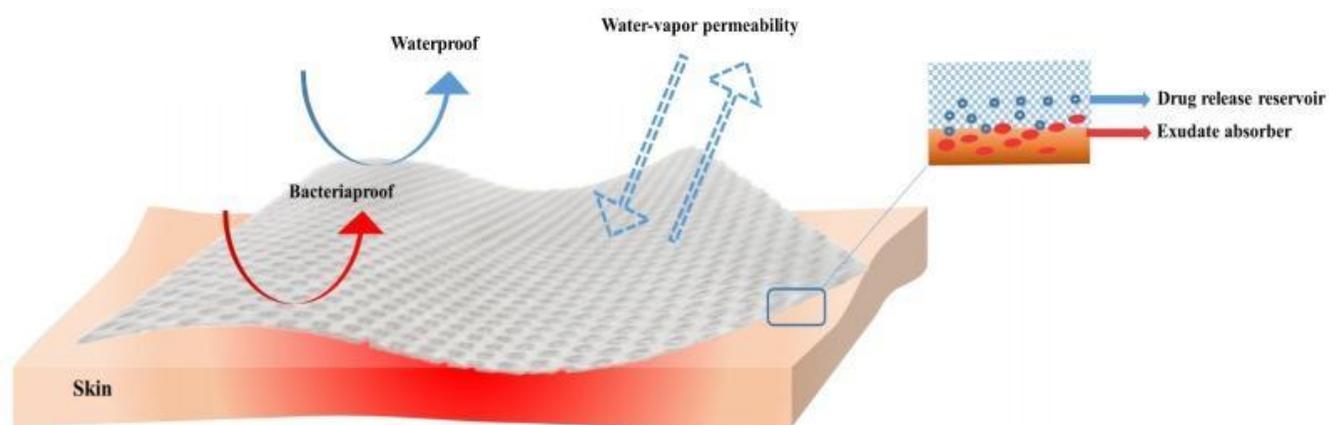


Figura 3. Ilustração das propriedades de um curativo ideal. Fonte: (NEGUT; GRUMEZESCU; GRUMEZESCU, 2018)

1.2. Curativos Bioativos

Os curativos tradicionais, sejam eles naturais ou sintéticos, como algodão ou gaze, têm demonstrado desvantagens tanto no processo de cura: por proporcionar baixa umidade para as feridas; quanto no desconforto dos pacientes: devido ao fato de aderirem à superfície das feridas (RADHAKUMARY; ANTONY; SREENIVASAN, 2011). Em vista que curativos tradicionais falham em promover um ambiente ideal para o ferimento, eles foram substituídos por curativos modernos com formulações mais avançadas: os denominados curativos bioativos. Preparados majoritariamente a partir de biomateriais, esses curativos atuam no processo de cicatrização ou na proteção da ferida contra micro-organismos patogênicos (BOATENG *et al.*, 2008). Exemplos de materiais modernos utilizados como matrizes para os curativos bioativos são: espuma de poliuretano, hidrocoloides, géis contendo iodo e hidrogéis (Tabela 1). Durante a década de 1990, o estudo de curativos sintéticos expandiu em um grupo variado que incluía,

além dos hidrocoloides, curativos com espuma sintética, malhas de silicone, adesivos para tecidos, filmes adesivos permeáveis e curativos formulados com prata (DHIVYA; VIJAYA; SANTHINI, 2015).

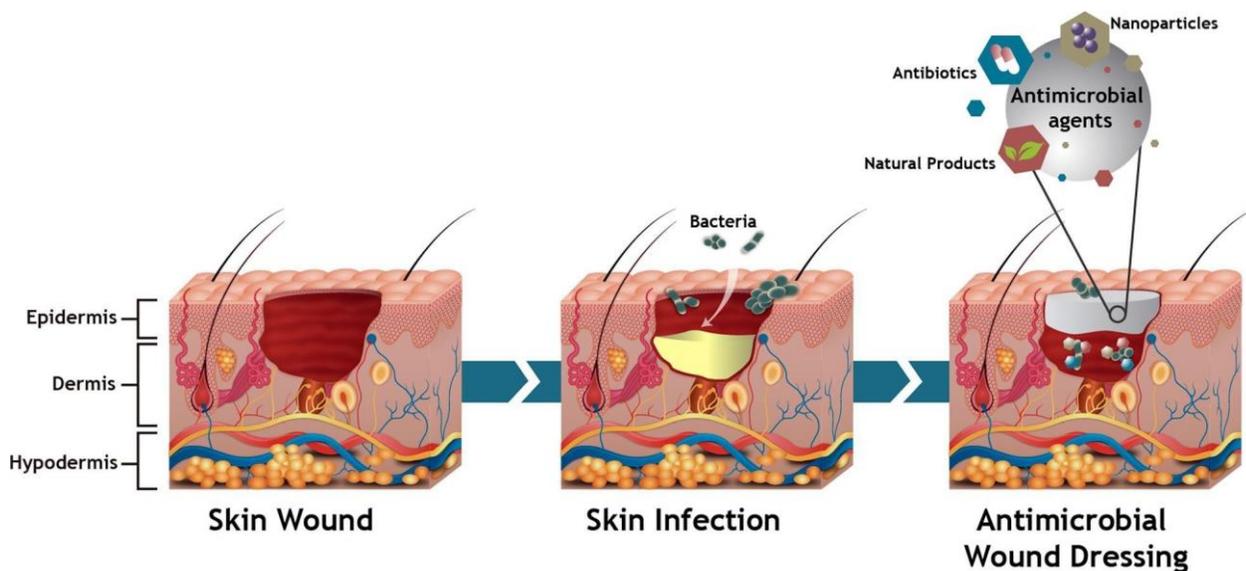


Figura 4. Ilustração de um curativo bioativo. Representação de um ferimento, de sua respectiva infecção por bactérias e da aplicação de um curativo bioativo com suas possíveis formulações. Na esquerda, a separação da hipoderme, derme e epiderme, de baixo para cima. Fonte: (SIMÕES *et al.*, 2018)

Formular matrizes com composições inovadoras e estruturas inteligentes tornou-se não só necessário, mas uma realidade. Existem protótipos de diversos tipos de curativos capazes de realizar a entrega de fármacos em dose-controlada através de termoativação ou da própria capacidade osmótica das suas matrizes, como a do hidrogel, que é de 70 % a 90 % composto por água. Uma ilustração do seu formato e da aderência a um ferimento pode ser observada na Figura 4, em que se vê um curativo antimicrobiano em formato cilíndrico, aderido ao ferimento cutâneo. Existem também protótipos de curativos injetáveis. Eles disponibilizam uma proposta de polimerização *in situ* e adaptável ao formato do ferimento, proposto para diabéticos que tenham seu processo de cicatrização debilitado (GREISER *et al.*, 2018). E até um curativo com um *chip* acoplado, que possibilita a comunicação *bluetooth* pelo celular do paciente (Figura 7). Assim, ele pode não só monitorar em seu celular o pH e a temperatura do ferimento medidos por sensores acoplados ao curativo; como também, através de um micro-

aquecedor na superfície do curativo, ativar a liberação de fármacos através da degradação de *microbeads* localizadas na bicamada curativa e consequente liberação do composto para a superfície do ferimento, de forma controlada e localizada (MOSTAFALU *et al.*, 2018).

Os pesquisadores estão buscando sistemas curativos cada vez mais precisos, personalizáveis, práticos e com propriedades antimicrobianas. Devem ser eficientes, com menor custo e citotoxicidade possível; e apresentar toxicidade ao maior espectro de micro-organismos patogênicos possível. Dentro desses sistemas, existem vários tipos de curativos sendo estudados e já comercialmente utilizados como matrizes para curativos bioativos. Nesta revisão de (KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017), pode-se observar alguns exemplos, suas principais propriedades, vantagens, desvantagens e suas respectivas taxas de utilização mundial em 2017 (Tabela 1).

Tabela 1. Tipos de materiais curativos e suas respectivas taxas de utilização mundial em 2017. Em destaque, como último tipo de curativo descrito, os hidrogéis: os materiais poliméricos com a maior taxa de utilização mundial em 2017 (43%). Traduzida e adaptada de (KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017).

Tipos de Curativos	Propriedades	Vantagens	Desvantagens	Taxa de Utilização Mundial (2017)
	Feitas de materiais como:	- Altamente absortivas	- Muito aderentes	
	- Poliuretano	- Mantém um ambiente úmido	- Formam camada opaca que dificulta a observação do ferimento	
	- Polietilenoglicol (PEG)	- Capacidade de anti-vazamento contra invasão bacteriana	- Semi-permeáveis a gases	
	- Camadas bilaminadas de silicone			5%
Espumas	<i>Adequadas para:</i> queimaduras, ferimentos crônicos, cavidades com	- Facilmente usadas	- Não-aplicáveis a ferimentos secos	(Espumas Poliméricas)

	formato de ferimento, e úlceras profundas	- Menor custo	- Pouca estabilidade	
Filmes	- Compostos por poliuretanos finos	- Boa permeabilidade a gases	- Difíceis de manusear	
	- Flexíveis	- Impermeáveis a fluidos e bactérias	- Aderência à bandagem do curativo	
	- Transparentes			
	- Filmes auto-adesivos	- Fácil monitoramento do ferimento através da transparência do filme	- Não-absorventes permitindo acúmulo de exsudatos do ferimento	8% (Filmes poliméricos)
	<i>Adequados para:</i> ferimentos superficiais, não contaminados e por <i>laser</i>	- Amenização da dor e menor maceração	- Suscetível facilmente a invasões bacterianas e infecções	
			- Permeável a proteínas e fármacos	
Alginatos		- Altamente absortivo		
	- Polímeros de alginato em forma de tecido (fibras);	- Não-aderente	- Alto custo	
	- Troca iônica ocorre com íons de Ca ²⁺ -alginato e Na ⁺ - soro sanguíneo.	- Alta estabilidade mecânica	- Odor desagradável	
		- Estável por um longo período de tempo	- Difícil de manusear	20% (Alginatos Poliméricos)
			- Indisponível devido à escassez da sua presença comercial	

		- Facilmente removível com solução salina		
	<i>Adequado para:</i> ferimentos cirúrgicos e queimaduras	- Boa barreira bacteriana		
		- Materiais altamente absorptivos	- Estrutura base com atividade anti-microbiana variável	
	- Sistema de duas fases de amido imobilizado com iodo, PEG-Dextrano, ou polímeros plásticos fibrosos	- Facilmente removível com salina ou água esterilizada	- Baixa citotoxicidade - Instável volumetricamente - Alto vazamento de exsudatos	
Hidrocoloides		- Não-aderente	- Hidrocoloides de dextrana atrasam o processo de cura	24% (Hidrocoloides Poliméricos)
		- Alta densidade - Materiais à prova d'água	- Impermeável a gases - Odor desagradável	
	<i>Adequado para:</i> úlceras crônicas e queimaduras	- Curativos sem dor	- Mudam de cor	
	- Polímeros naturais e sintéticos - Alta capacidade absorptiva - Usados como agente calmante e para o resfriamento de ferimentos cutâneos	- Alta capacidade absorptiva de exsudatos (como pus) - Não-aderentes (removidos do ferimento com mais facilidade e menos dor)	- Semi-transparentes - Semi-permeáveis a gases e vapor d'água - Barreira bacteriana ineficiente	43% (Hidrogeis Poliméricos)
Hidrogeis	<i>Adequados para:</i> a maioria de tipos de ferimentos e queimaduras			

- Aceleram o processo de cura	- Algumas vezes baixa estabilidade mecânica
- Reduzem a dor e inflamação	
- Menor custo	
- Fácil de produzir e lidar	

1.3. Hidrogéis

Materiais acessíveis, com rápida polimerização, alto teor aquoso e que tiveram um grande crescimento de publicações nos últimos anos (Figura 6): os promissores hidrogéis. Eles são minimamente compostos por uma solução base com grande quantidade de água (como tampão fosfato salino ou outras soluções tamponadas), um polímero (como PEG – Polietilenoglicol, ou quitosana, por exemplo) e os agentes polimerizantes que possibilitam seu estado de gel (como APS - Persulfato de amônio, e TEMED - N, N, N', N'-Tetrametiletlenodiamina). Os hidrogéis representam uma compressão de uma grande quantidade de água dentro de uma matriz tridimensional gelificada (ZHANG *et al.*, 2019), o que os classifica como uma ótima matriz extracelular para entrega de fármacos e também como superfícies curativas. Normalmente, um curativo bioativo com formulação de hidrogel pode manter o ferimento em um ambiente consideravelmente úmido e absorver exsudatos, como pus (QU *et al.*, 2018). Por isso, além de ser considerado um material biocompatível, é um candidato promissor para aplicações biomédicas, como por exemplo um curativo bioativo. Estes tipos de curativos são compostos por hidrogéis formulados com diferentes tipos de compostos bioativos, como antibióticos ou antifúngicos. As mais diferenciadas formulações permitem a flexibilização do modo de aplicação - possibilitando polimerização *in situ* para melhor adesão ao ferimento e para entrega local de fármacos (MAURI *et al.*, 2019) - e também

do tipo de aplicação - seja em ferimentos agudos ou crônicos, queimaduras, úlceras ou amputações.

A primeira publicação sobre hidrogéis registrada já possuía finalidade médica: em 1955, na República Tcheca, com o título de “Hidrogel de Mucina como uma nova base para pomadas oftálmicas” (SIMALJAKOVA, 1955). Porém, além de o artigo estar em tcheco e só possuir o registro do título na plataforma PubMed, ele também está inacessível, impossibilitando a análise da metodologia e esclarecimento sobre a utilização desse hidrogel. Da década de 1960 até a década de 1980, as publicações sobre hidrogéis focavam principalmente em suas aplicações como lentes de contato (DANIELE *et al.*, 1968, CAVANAGH; BODNER; WILSON, 1980). Duas das primeiras experiências clínicas acessíveis publicadas sobre hidrogéis como curativos foram em 1984, respectivamente na Alemanha (KNAPP; RAHN; SCHAUWECKER, 1984) e na Grã-Bretanha (YATES; HADFIELD, 1984). Na Alemanha, os pesquisadores fizeram experimentações clínicas com hidrogéis de ágar e poliacrilamida em pacientes após transplantes de pele, que na época foram chamados de *Geliperm*. Eles disseram que o curativo, além de condicionar a homeostase do ferimento nos primeiros dias críticos após os transplantes, protegiam o ferimento de invasões bacterianas, mantinham ambos o ferimento e o implante úmidos, e ainda absorviam parcialmente os exsudatos do ferimento. Os autores também mencionaram que, devido à alta elasticidade, o chamado *Geliperm* poderia se adaptar à superfície do ferimento, sem necessidade de colá-lo; e que as chances de cura poderiam ser consideravelmente aumentadas pelo uso desses hidrogéis. Na Grã-Bretanha, os autores descreveram a experiência do Departamento de Acidentes e Emergências que usaram um curativo de gel de óxido de polietileno, chamado de *Vigilon* (Figura 5), utilizado por eles durante dezoito meses. Eles descreveram o material como contendo 96 % de água e sendo virtualmente transparente e disseram que, apesar de ele ser mais difícil de manipular com fórceps do que curativos secos, sua conformidade e adesão com a pele era muito superior. Também foi reportado que não haveria dor ou dificuldade associadas à remoção do curativo e que, dos cinquenta e nove pacientes que utilizaram o curativo - em ferimentos de queimaduras parciais ou totais, ou perdas traumáticas de pele - somente quatro apresentaram infecções.



Figura 5. Representação do curativo *Vigilon*. Na imagem, o curativo sendo utilizado sob uma queimadura parcial na perna de um paciente. Fonte: (YATES; HADFIELD, 1984)

Trinta e cinco anos após a experimentação clínica satisfatória dos britânicos com o curativo *Vigilon*, o interesse em estudar hidrogéis com diferentes formulações e aplicações curativas tem crescido (Figura 6). Em dez anos, de 2005 a 2015, o número de publicações com essa temática quase quintuplicou. Esta revisão de 2017 é a publicação mais recente a ter quantificado o uso de hidrogéis como curativos (KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017).

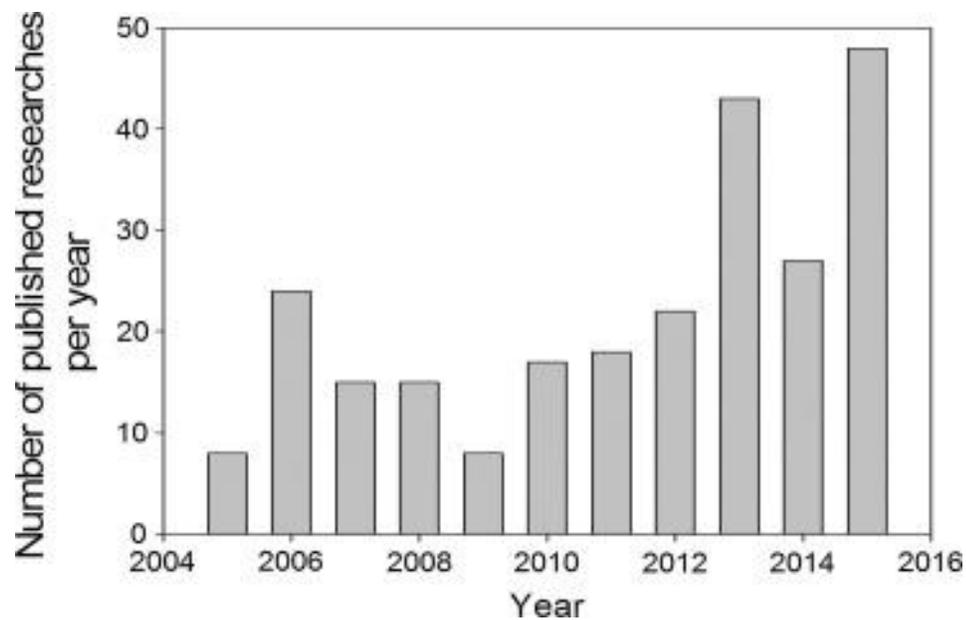


Figura 6. Publicações sobre o uso de hidrogéis como curativos. Levantamento quantitativo realizado utilizando as plataformas PubMed e Scopus, que mostra o número de publicações sobre hidrogéis com aplicação curativa entre 2005 a 2015. Fonte: (KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017)

Estudos cada vez mais interdisciplinares têm sido realizados pautando hidrogéis (Figura 7), não só como matrizes ou parte de um sistema curativo, mas também possuindo as mais inovadoras finalidades. Um dos estudos mais atuais, publicado na revista *Nature* em Novembro de 2019, reporta uma seda artificial de aranha a partir de fibras de hidrogel. A intenção, segundo os autores, é utilizar o potencial de absorção de energia cinética das fibras desenvolvidas para aplicações em absorções de choques mecânicos, como por exemplo na fabricação de materiais anti-impacto (DOU *et al.*, 2019). Além das diversas aplicações curativas, hidrogéis também são utilizados para aplicação em cultura de células (DAROUIE *et al.*, 2019), como dispositivos ingeríveis para monitoramento gástrico (LIU *et al.*, 2019), como lentes customizadas (CHILDS *et al.*, 2016), como plataformas desintoxicantes (GOU *et al.*, 2014) e até para aplicações como biorremediadores (CARVALHO *et al.*, 2019).

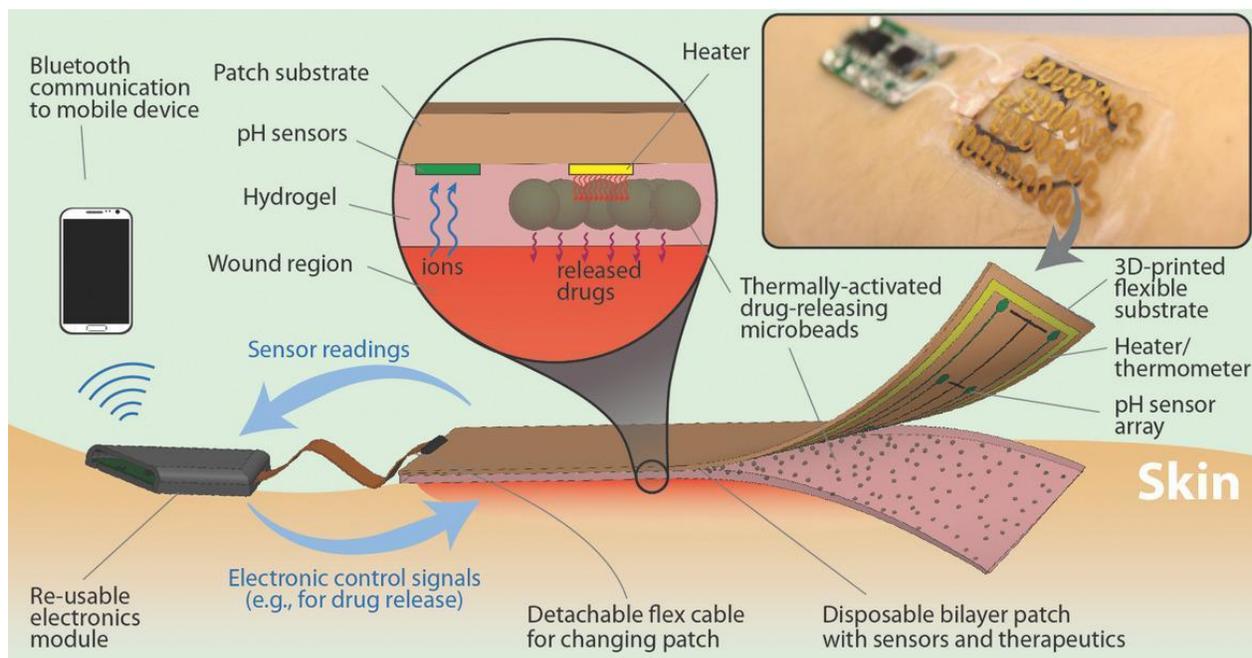


Figura 7. Ilustração de um curativo inteligente com matriz de hidrogel formulada com fármaco. No canto superior esquerdo, vê-se um celular demonstrando a comunicação *bluetooth* ao aparelho móvel, que é permitida pela presença de um módulo eletrônico reutilizável acoplado ao curativo por meio de um cabo removível. Esse módulo emite sinais de controle para o curativo (por exemplo: para liberação de fármacos formulados no curativo) e também recebe leituras através dos sensores de pH e temperatura, que podem ser lidos no celular. A camada oclusiva do curativo acima do hidrogel, que age como bandagem, é produzida com impressoras 3D e, acoplado a ela (demonstrado em amarelo na figura), está um aquecedor. Quando o módulo eletrônico emite o sinal de controle para a liberação do fármaco, que está contido em *microbeads* na matriz de hidrogel, essas *beads* são degradadas, liberando o fármaco na região do ferimento, de forma precisa e monitorada. Fonte: (MOSTAFALU *et al.*, 2018).

1.4. Ureases e Jaburetox

Ureases (ureia amidohidrolases) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise da ureia, formando amônia e dióxido de carbono (KRAJEWSKA, 2009; MOBLEY; HAUSINGER, 1989). Jaburetox (Jbtx) é um polipeptídeo recombinante, intrinsecamente desordenado (LOPES *et al.*, 2015; MULINARI *et al.*, 2007; POSTAL *et al.*, 2012) derivado da urease de *Canavalia ensiformis* (Jack bean urease - JBU). Ambos JBU e Jbtx apresentam potencial inseticida, sendo que Jbtx apresenta um espectro maior de atividade contra insetos (MULINARI *et al.*, 2007), pois não é necessária a clivagem prévia como ocorre em JBU (FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000). Além da atividade inseticida,

Jbtx apresenta atividade contra fungos de importância biomédica e agrônômica (POSTAL *et al.*, 2012) e dados preliminares indicam a possível atividade antibacteriana de Jbtx contra bactérias como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (BECKER-RITT; PORTUGAL; CARLINI, 2017). Recentemente, foi publicado um artigo referente à segurança do Jbtx. De acordo com os autores, sua sequência de aminoácidos não mostrou similaridade relevante com proteínas tóxicas, antinutricionais ou alergênicas. Adicionalmente, Jbtx foi suscetível à digestão *in vitro*. Em conjunto os resultados não identificaram riscos potenciais de efeitos adversos e reações associadas ao Jbtx (Sá *et al.*, 2019). Portanto, considerando as importantes atividades antimicrobianas, Jbtx é um peptídeo promissor como candidato a novos fármacos antibióticos e antifúngicos (BECKER-RITT; PORTUGAL; CARLINI, 2017).

Caracterizado em 2007 por (MULINARI *et al.*, 2007), desde a publicação de sua identificação até Novembro de 2019 foram publicados outros vinte artigos sobre Jbtx. Dentre os estudos, um dos principais enfoques é a capacidade inseticida do Jbtx: o peptídeo já foi demonstrado como agente capaz de permeabilizar membranas através de um mecanismo dependente de canais iônicos (PIOVESAN *et al.*, 2014), uma das propriedades que o caracterizam com potencial biopesticida (SILVA *et al.*, 2019). Enquanto a maioria das publicações descrevem as propriedades inseticidas do peptídeo, algumas já indicam seu potencial antifúngico (Tabela 2). Na literatura, não existe nenhuma publicação explorando o potencial antifúngico do Jaburetox em uma matriz curativa. No trabalho de conclusão do curso do biotecnologista Lucas Franz (FRANZ, 2018) - em dados ainda não publicados - o peptídeo recombinante foi formulado em *scaffolds* de Poli(ácido láctico), para aferir sua atividade antifúngica em *Candida albicans*. Destarte, há uma demanda por novos estudos descrevendo o potencial antifúngico de Jbtx em diferentes matrizes e formulações, visando aplicações biotecnológicas diversas.

Tabela 2. Propriedades biológicas ureólise-independentes de selecionadas ureases e peptídeos derivados de ureases. CNTX, *canatoxin* (*C. ensiformis*); JBU, *jackbean urease* (*C. ensiformis*); eSBU, *embryo-specific soybean urease* (*G. max*); uSBU, *ubiquitous soybean urease*; GHU, *Gossypium hirsutum* (algodão) *urease*; PPU, *pipeon pig urease* (*C. cajan*); SPU, *S.*

pasteurii urease; HPU, *H. pylori* urease; PMU, *P. mirabilis* urease; BJU, *B. japonicum* urease; JBTX, jaburetox; SYTX, soyuretox. Traduzido e adaptado de: (KAPPAUN *et al.*, 2018)

Ureases e peptídeos derivados	Propriedades Entomotóxicas	Atividade Antifúngica	Neurotoxicidade em Mamíferos	Excitose em plaquetas	Sinalização Eicosanoide	Atividade Quimiotática
-------------------------------	----------------------------	-----------------------	------------------------------	-----------------------	-------------------------	------------------------

PLANTAS

CNTX	✓	✓	✓	✓	✓	✓
JBU	✓	✓	✓	✓	✓	✓
eSBU	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	✓
uSBU**	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	n.d.
GHU	n.d.	✓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PPU	✓	✓	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

BACTÉRIAS

SPU	X	n.d.	X	✓	✓	n.d.
HPU**	X	✓	✓	✓	✓	✓
PMU**#	✓	✓	n.d.	✓	n.d.	n.d.

PEPTÍDEOS DERIVADOS DE UREASE

JBTX**	✓	✓	X	X	✓	n.d.
SYTX**#	✓	✓	X	n.d.	n.d.	n.d.

Em 1978, o primeiro uso de cetoconazol em formulação oral foi descrito (LEVINE; COBB, 1978). O estudo abordava a aplicação do fármaco como terapia para o tratamento de coccidiodomicose. Ele foi o primeiro composto disponível para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e, por quase uma década, era o fármaco padrão para o tratamento de micoses endêmicas - que não apresentassem risco de vida ao paciente (MAERTENS, 2004). Porém, mais de trinta anos depois, com o reconhecimento de diversos supostos efeitos adversos como hepatotoxicidade e disfunção hormonal (YAN *et al.*, 2013), o uso da formulação oral de cetoconazol tem sofrido diversas mudanças na rotulação, e também há recolhimento de produtos no mercado (GUPTA; LYONS, 2015). Segundo GUPTA em seu artigo “O crescimento e a queda da formulação oral de cetoconazol”, o antifúngico em sua formulação tópica, por sua vez, tem sido eficiente e seguro no tratamento de infecções fúngicas superficiais; e amplamente prescrito para o tratamento de micoses superficiais.

Apesar do cetoconazol ser um fármaco com baixa solubilidade em água e ser dissolvido em outras soluções - como dimetilsulfóxido (DMSO) -, até uma concentração de 100 µg/mL a solução de cetoconazol é homogênea, estável e não apresenta precipitado (KATAOKA *et al.*, 2019). Ainda devido a sua baixa solubilidade, e reconhecendo sua relevância médica, mecanismos de entrega de fármacos (como matrizes que facilitem a solubilização do cetoconazol) têm sido cada vez mais estudados.

1.6. JUSTIFICATIVA

Uma preocupação recorrente da saúde pública mundial é a contaminação de ferimentos por micro-organismos patogênicos. Estratégias mais eficientes para prevenir ou atenuar tais contaminações, e evitar possíveis infecções, são alvo de interesse de profissionais da saúde e também de biotecnologia. A pele, nossa primeira grande camada de proteção contra esses micro-organismos, pode atuar tanto como uma barreira crucial, quanto como uma porta de entrada para patógenos. Por isso, realizar a assepsia e garantir a cicatrização de ferimentos tópicos é uma ação crucial para barrar

a entrada sistêmica de micro-organismos patogênicos ou oportunistas. Uma estratégia promissora, que tem sido alvo de diversas pesquisas, são os biocurativos em matrizes formuladas com moléculas que apresentam atividade antimicrobiana, como a proteína recombinante Jbtx e o fármaco antifúngico cetoconazol. Esses estudos visam a obtenção de moléculas inovadoras com atividade antimicrobiana, que possibilitem cada vez mais a cura eficiente, além da acessibilidade e da diminuição de custo dos tratamentos por curativos. Nos últimos quatro anos, o número de estudos publicados sobre hidrogéis como plataformas curativas e de entrega de fármacos aumentou gradualmente. Esse aumento significativo de publicações utilizando hidrogéis como matriz curativa, aliado ao potencial biotecnológico do Jbtx e a já descrita capacidade antifúngica do cetoconazol, expõem a importância deste projeto: o desenvolvimento de um curativo bioativo utilizando Polietilenoglicol metacrilado como biopolímero, para o preparo de um hidrogel contendo agentes antifúngicos. Dentre todas formulações já publicadas sobre hidrogéis, são escassas as informações e pesquisas que exploram o potencial e mecanismo de entrega de moléculas antifúngicas ao invés do tradicional enfoque antibacteriano. Destarte, é reconhecível a necessidade de dados mais robustos sobre a atividade antifúngica do peptídeo recombinante Jbtx, juntamente com a do antifúngico cetoconazol em uma formulação curativa.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo geral

Formular e estabilizar dois tipos de hidrogéis à base de Polietilenoglicol metacrilado formulados ou com a proteína recombinante Jaburetox, ou com o fármaco antifúngico cetoconazol.

1.7.2. Objetivos específicos

- Realizar uma análise bibliográfica sobre os termos-chave do trabalho com estimativas quantitativas de suas publicações por ano na plataforma PubMed;

- Produzir Jbtx e purificar a proteína utilizando técnicas de cromatografia de afinidade e gel filtração;
- Polimerizar e estabilizar hidrogéis contendo somente Jbtx, somente cetoconazol, ou contendo ambos Jbtx e cetoconazol;
- Avaliar a ação antifúngica dos hidrogéis formulados;
- Avaliar *in vitro* a viabilidade celular de queratinócitos humanos em contato com as matrizes de hidrogéis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análise Bibliográfica

Realizou-se a análise prospectiva de artigos sobre termos-chave do trabalho por meio da busca avançada no banco de dados PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Os termos pesquisados obrigatoriamente deveriam estar citados no título e/ou no resumo do trabalho. Os dados foram atualizados em Novembro de 2019 e foram consideradas publicações até 2019 e publicações já previstas para 2020 pelo banco de dados da plataforma. Os termos-chave utilizados foram: “*hydrogel*”, “*wound dressing*”, “*antifungal*” e “*ketoconazole*”, dos respectivos termos em português “hidrogel”, “curativo”, “antifúngico” e “cetoconazol”; em pesquisas isoladas ou combinando os termos para buscas mais específicas. Utilizou-se o Excel para gerar os gráficos.

2.2 Produção e purificação do peptídeo recombinante Jaburetox

A produção da proteína recombinante Jbtx foi realizada utilizando *E. coli* BL21(DE3)-RIL contendo o plasmídeo pET23a-Jaburetox. Foram cultivadas em 45 mL de caldo LB (Luria Bertani) e com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (40 µg/mL) *overnight* a 37 °C. Todo o conteúdo dos cultivos foi inoculado em 1 L de meio de autoindução (triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹, glicerol 5 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 3,3 g.L⁻¹, KH₂PO₄ 6,8 g.L, Na₂HPO₄ 7,1 g.L⁻¹, glicose 0,5 g.L⁻¹ e lactose 2 g.L⁻¹ e MgSO₄ 0,12 g.L⁻¹), juntamente com ampicilina e cloranfenicol, nas mesmas concentrações; cultivado a 37 °C e 150 rpm, até alcançar uma absorbância de aproximadamente 0,7 a 600 nm. As condições de indução foram: *overnight*, 20 °C, 150 rpm. Após o cultivo, centrifugou-se as células a 8.000 x g durante 10 min a 4 °C. As células foram então ressuspensas em tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 20 mM de imidazol) e lisadas em sonicador de ponta por 20 ciclos de 1 min com frequência de 99 Hz. Separou-se o sobrenadante por centrifugação a 15.000 x g por 40 min a 4 °C, o qual foi adicionado a uma coluna de afinidade *Chelating Sepharose* (GE Healthcare)

carregada com Ni^{2+} e previamente equilibrada com o tampão A. Foi efetuada a lavagem da coluna com tampão B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 70 mM de imidazol) e a eluição foi realizada com tampão C (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 500 mM de imidazol). A fração rica em Jbtx foi transferida para uma coluna *Hiload Superdex 200 26/60 prep grade*, pré-equilibrada com tampão D (fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM e Tris 2-carboxietil fosfina - TCEP 1 mM), montada em um sistema Äkta Purifier (GE Life Technologies) (LOPES *et al.*, 2015). A pureza da amostra foi verificada através de SDS-PAGE 15 % e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e por análises de absorvância em espectrofotômetro em 280 nm, considerando o coeficiente de extinção molar 0,405 (cisteínas reduzidas) e 0,416 (cistinas).

2.3 Produção de Hidrogéis

O peptídeo Jbtx foi dialisado contra tampão fosfato salino PBS (20 mM fosfato de sódio e 150 mM de cloreto de sódio) *overnight* a 4°C. Após, foi quantificado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Utilizamos quatro concentrações diferentes de Jbtx (8,25 μM ; 16,5 μM ; 24,75 μM ; 33 μM) e três doses diferentes do antifúngico cetoconazol (10 μg ; 20 μg ; 40 μg) que foram previamente esterilizadas, ou com filtros 0,22 μm ou com radiação Ultravioleta (UV) em câmara de Fluxo Laminar vertical. Os hidrogéis formulados contendo ambos Jbtx e cetoconazol foram formulados com Jbtx 33 μM e cetoconazol 40 μg . A Solução de PBS contendo Jbtx foi o veículo para a produção dos hidrogéis, que foram preparados em placas de 24 poços estéreis, com um volume final de 500 μL por poço. Polietilenoglicol metacrilado (PEGm - 15 %) foi homogeneizado junto à solução contendo somente PBS (controle), contendo a proteína (Jbtx) ou contendo o fármaco antifúngico (cetoconazol). Posteriormente, foram adicionados os agentes iniciadores, testando duas combinações diferentes: 1) Persulfato de amônio (APS) 10 mM e N, N, N', N'-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) ou 2) Persulfato de amônio (APS) e Bissulfito de sódio.

2.4 Atividade antifúngica

Candida albicans CE022 foi cultivada em placas de ágar Sabouraud por 24 h a 28 °C. Após o tempo de incubação, algumas colônias foram emulsionadas em solução salina (cloreto de sódio 0,85 %) e quantificadas em câmara de Neubauer. Placas de 24 e 12 poços estéreis foram utilizadas para o ensaio. Os hidrogéis foram incubados com 10^4 células/mL de *C. albicans* e caldo Sabouraud, com um volume final de 2 mL, a 28°C por 24 h. Como controle negativo, foram utilizadas as matrizes de hidrogéis sem incorporação de Jbtx, apenas com PBS; e como controle de crescimento, colocou-se 2 mL da suspensão sem as matrizes de hidrogéis. Após 24 h de incubação, foram diluídos seriadamente 20 µL de cada poço em 180 µL de solução salina e plaqueados em placas contendo ágar Sabouraud pelo método de *Drop plate* (Figura 9) para determinar o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) após incubação das placas por 24 h a 28 °C (MARTINELLI *et al.*, 2017). Também calculou-se a viabilidade das colônias de *C. albicans* (em porcentagem), considerando o Controle PBS como 100% de viabilidade, e realizando o cálculo comparativo das outras formulações ao controle, em %.

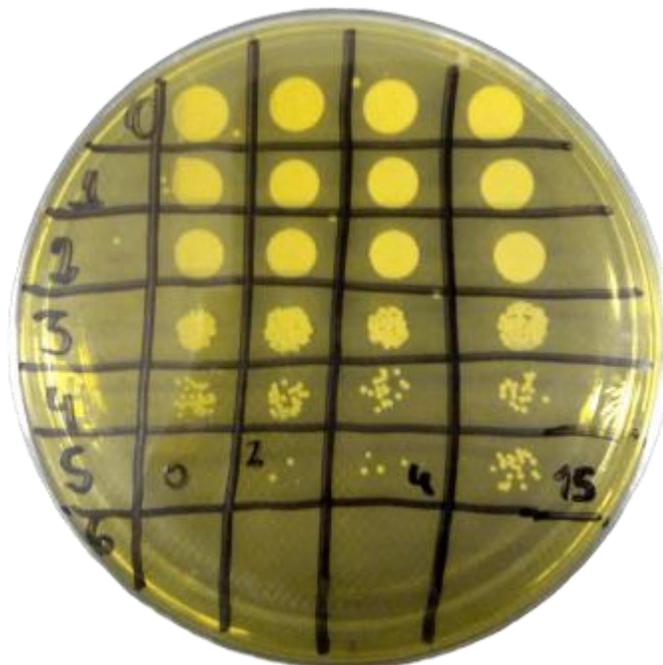


Figura 9. Representação do método *Drop Plate*. A placa representa a diluição seriada do controle de crescimento para garantir que houve formação de colônias, ou seja, a suspensão de *Candida albicans* sem a presença dos hidrogéis. Na esquerda, de 0 a 6, as diluições em sequência crescente. São contadas as colônias da última diluição em que haja formação das mesmas, de cada replicata técnica. Nesse caso, em três das replicatas ocorreu na diluição 10^5 e na primeira replicata, ocorreu na diluição 10^4 . Fonte: Autora.

2.5 Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos (HaCaT) humanos

As matrizes de hidrogel com cetoconazol, além dos controles, foram esterilizadas antes da polimerização, utilizando filtros de $0,22\ \mu\text{m}$. Após, foram incubadas com 25.000 queratinócitos humanos (HaCaT) por poço, previamente quantificados em câmara de Neubauer em 1 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina: estreptomicina. As células em contato com as matrizes foram incubadas por 48 h em estufa a $37\ ^\circ\text{C}$ com teor de 5 % de CO_2 . Após 48 h, foi então realizado o teste de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). Os sobrenadantes dos poços de cultivo foram descartados e as células aderidas nas matrizes ou nos poços (controle negativo) foram incubadas com o reagente de MTT a $0,25\ \text{mg/mL}$ por 4 h a $37\ ^\circ\text{C}$. Após este tempo de incubação, foram adicionados $500\ \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) – duas lavagens de $250\ \mu\text{L}$ cada, incubados por 25 min sob agitação. Os resultados foram obtidos por meio da absorbância a $570\ \text{nm}$. Estes testes foram realizados no Laboratório de Sinalização Celular do Centro de Biotecnologia da UFRGS coordenado pelo Professor Guido Lenz, com o auxílio da bolsista de Iniciação Científica do laboratório, Luiza Cherobini Pereira.

2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados pelo teste de ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey, usando o software GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows). Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Revisão Bibliográfica

Com o intuito de obter um viés quantitativo sobre a tendência de publicações dos termos-chave deste trabalho, foram realizadas diversas estimativas (Figuras 10 a 14). Essas análises prospectivas, apesar de não serem um demonstrativo exato do número de trabalhos sobre os temas-chave pesquisados - o que exigiria uma curadoria minuciosa e uma busca incluindo outros termos similares aos de interesse - auxiliam na compreensão da realidade atual sobre as temáticas abordadas neste trabalho. Observando que não existia na literatura uma análise temporal e completa sobre o número de publicações de cada um desses temas ao longo dos anos, foram realizadas estimativas de cada um dos termos de interesse em uma plataforma referência - a qual também foi utilizada como base de dados referência para a integralidade desse trabalho - a plataforma PubMed.

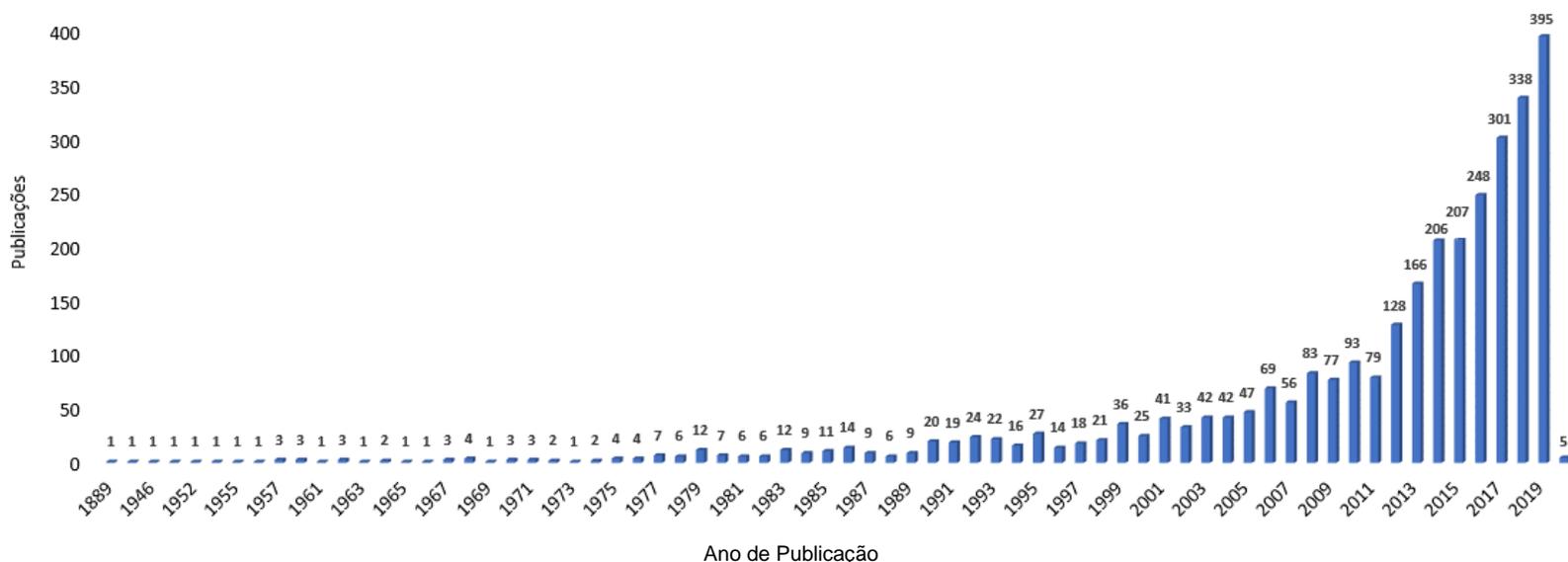


Figura 10. Estimativa de publicações sobre curativos. Representação gráfica de todos os estudos sobre curativos publicados

até Novembro de 2019 na base de dados PubMed. A figura mostra desde a primeira publicação, em 1889, até os cinco estudos já previstos para serem publicados em 2020, demonstrando as publicações por ano registradas na plataforma. A quantificação foi feita utilizando a busca avançada do PubMed utilizando o termo “*wound dressing*” como termo chave, obrigatoriamente presente no título ou no *abstract* dos resultados. A intenção foi realizar uma análise prospectiva de todas as publicações sobre curativos já catalogadas em uma base de dados referência (PubMed) e separá-las pelo intervalo de tempo das publicações. O gráfico foi gerado utilizando o Excel. Fonte: Autora.

Passados cento e trinta anos da publicação do primeiro trabalho descrevendo um curativo (LLOYD, 1889), a cada ano têm-se publicado cada vez mais (Figura 4) sobre os mais variados tipos de curativos, com matrizes inovadoras e sistemas cada vez mais complexos. A maioria dessas publicações investiga sistemas bioativos (principalmente formulados com fármacos com um sistema de entrega controlado), acessíveis, eficientes e biocompatíveis, a fim de suprir as demandas da medicina moderna. Uma das matrizes mais utilizadas para formular esses sistemas bioativos são os hidrogéis (Figura 11).

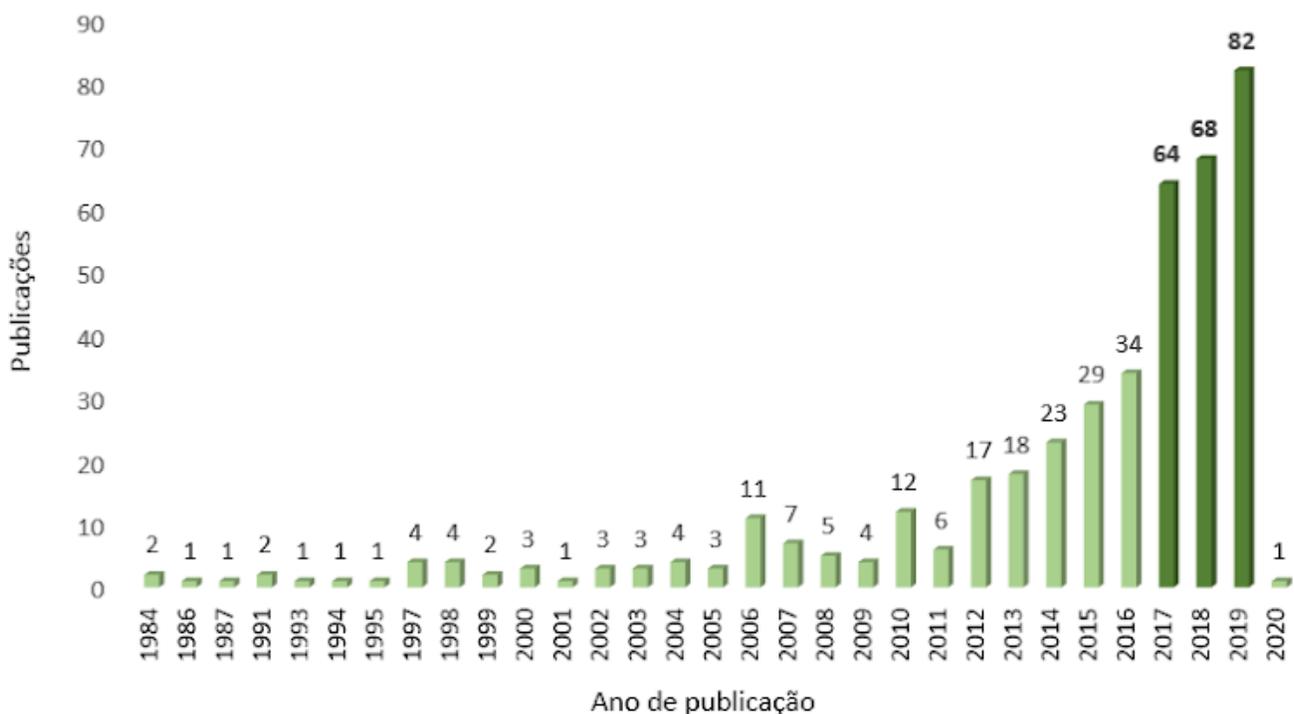


Figura 11. Estimativa de publicações sobre hidrogéis. Representação gráfica de todos os estudos pautando hidrogéis como aplicações curativas publicados até Novembro de 2019 na base de dados PubMed. A figura mostra todas as publicações por ano, desde a primeira publicação em 1984 até um estudo já previsto para ser publicado em 2020. Em verde mais escuro, o intervalo de publicações crescentes entre 2017 e 2019, evidenciando 2019 como o ano com mais publicações sobre hidrogéis como

curativos dentre todos os anos analisados. A quantificação foi feita utilizando a busca avançada do PubMed utilizando os termos “hydrogel” e “wound dressing” como termos chaves, obrigatoriamente presentes no título ou no *abstract* dos resultados. Também foi realizada uma curadoria dentre os artigos de 2017 a 2019 para garantir que todos os 214 artigos selecionados de fato apresentavam hidrogéis como matrizes curativas. A intenção foi realizar uma análise prospectiva de todas as publicações sobre hidrogéis como curativos já catalogadas em uma base de dados referência (PubMed) e separá-las pelo intervalo de tempo das publicações. O gráfico foi gerado utilizando o Excel. Fonte: Autora.

Sessenta e cinco anos após a primeira publicação sobre um hidrogel na plataforma PubMed (SIMALJAKOVA, 1984), as publicações sobre hidrogéis como matrizes curativas nessa plataforma só cresceram (Figura 11), inclusive com o ano de 2019 registrando o maior número desde então. Além de apresentarem formulações cada vez mais variadas e que atendem a um espectro maior de ferimentos e aplicações, eles também têm se tornado parte de sistemas cada vez mais complexos para monitoramento de ferimentos. A fim de compreender sobre o que pautavam essas pesquisas de hidrogéis e se elas de fato apresentavam uma tendência recente de crescimento, foi realizado também uma análise quantificando as publicações sobre hidrogéis: como curativos; formulados com antifúngicos; ou formulados especificamente com cetoconazol. Por isso, em adição à observação da estimativa de publicações dos termos-chave de forma isolada, também foram realizadas combinações entre os termos para compreender o quão as conexões entre eles já haviam sido exploradas na literatura (Figura 12). Foi possível observar que, além de haver poucas publicações pautando hidrogéis com formulações antifúngicas (88 publicações no total de hidrogéis formulados com antifúngicos e somente 14 publicações registrando hidrogéis formulados com o antifúngico cetoconazol), a grande concentração dessas publicações havia sido nos últimos quatro anos (de 2016 a 2019). Nas três combinações observadas, o período de 2016 a 2019 havia representado 50 % (no caso de hidrogéis formulados com cetoconazol) ou mais (58 % no caso de hidrogéis formulados com antifúngicos e 59,5 % no caso de hidrogéis como curativos). Esse resultado indica que hidrogéis contendo aplicações curativas ou formulações antifúngicas - especialmente cetoconazol - ainda não são temas tão explorados na literatura. Porém, observa-se um crescimento significativo de estudos avaliando os últimos quatro anos.

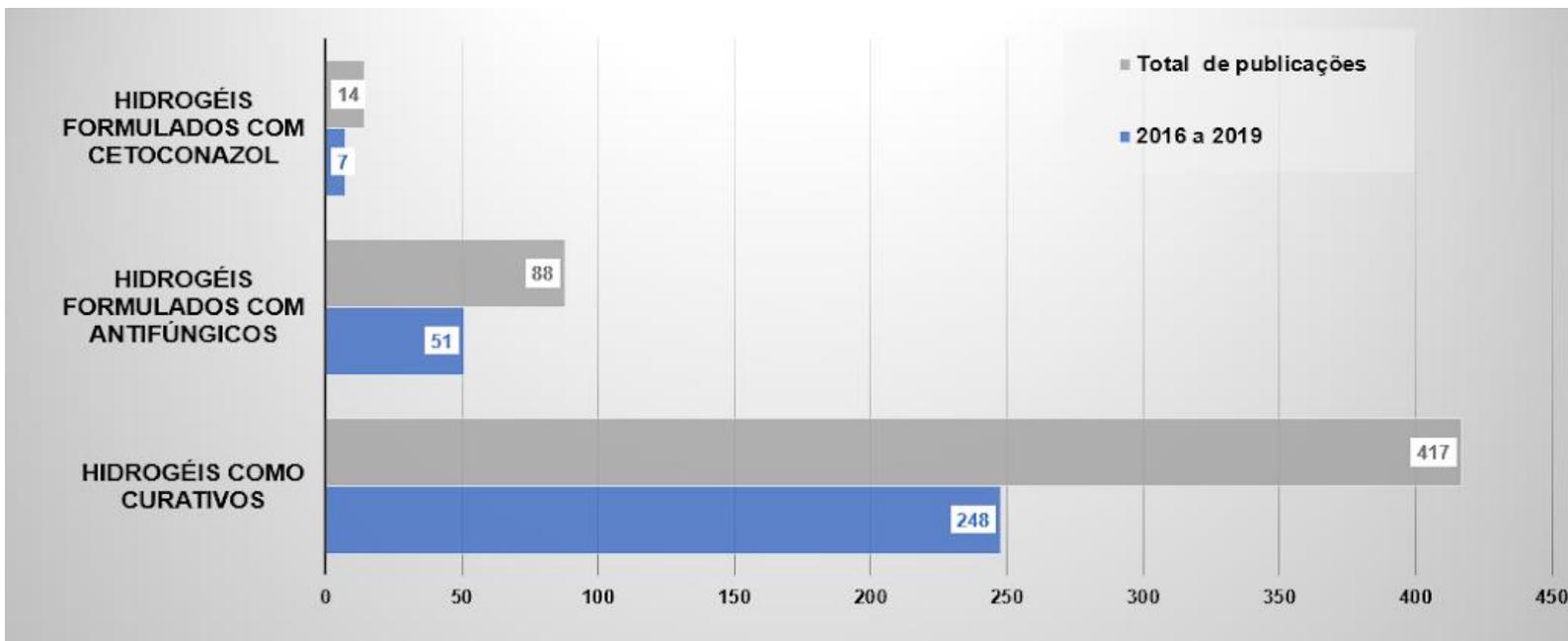


Figura 12. Estimativa de publicações sobre hidrogéis com aplicações diversas. Representação gráfica de todos os estudos sobre hidrogéis formulados com cetoconazol ou com antifúngicos, ou utilizados como plataformas curativas, publicados até Novembro de 2019 na base de dados PubMed. A figura mostra a estimativa da quantidade de publicações sobre hidrogéis com diferentes formulações e aplicações em sua totalidade (em cinza) e no intervalo dos últimos quatro anos (em azul). A quantificação foi feita utilizando a busca avançada do PubMed utilizando em todos os casos o termo “*hydrogel*” como termo chave; e em cada caso incluindo um segundo termo chave: no primeiro caso “*ketoconazole*”, no segundo “*antifungal*” e no terceiro “*wound dressing*”; obrigatoriamente com os dois termos chaves presentes no título ou no *abstract* dos resultados. A intenção foi realizar uma análise prospectiva de todas as publicações sobre hidrogéis com essas três aplicações já catalogadas em uma base de dados referência (PubMed). O gráfico foi gerado utilizando o Excel. A linha reta em branco representa a tendência linear das publicações desde 1978 até a previsão para 2020, demonstrando que além de cetoconazol ter sido um tema crescente de publicação, tende a permanecer crescendo em 2020. Fonte: Autora.

Dois termos-chave desse trabalho que ainda não possuíam uma análise bibliográfica e quantitativa completa descrevendo suas publicações por ano na literatura eram os antifúngicos (Figura 13) e cetoconazol (Figura 14). A ascensão de publicações abordando antifúngicos, apesar de não ter sido rápida, tem sido linear dentre os setenta e quatro anos de publicações sobre esse tema. Desde 1995, todos os últimos vinte e cinco anos tem batido, sem exceção, o recorde de publicações anuais sobre antifúngicos. Isso faz de 2019 - já em Novembro - com 3334 registros, o ano com mais publicações sobre antifúngicos em todo histórico do PubMed.

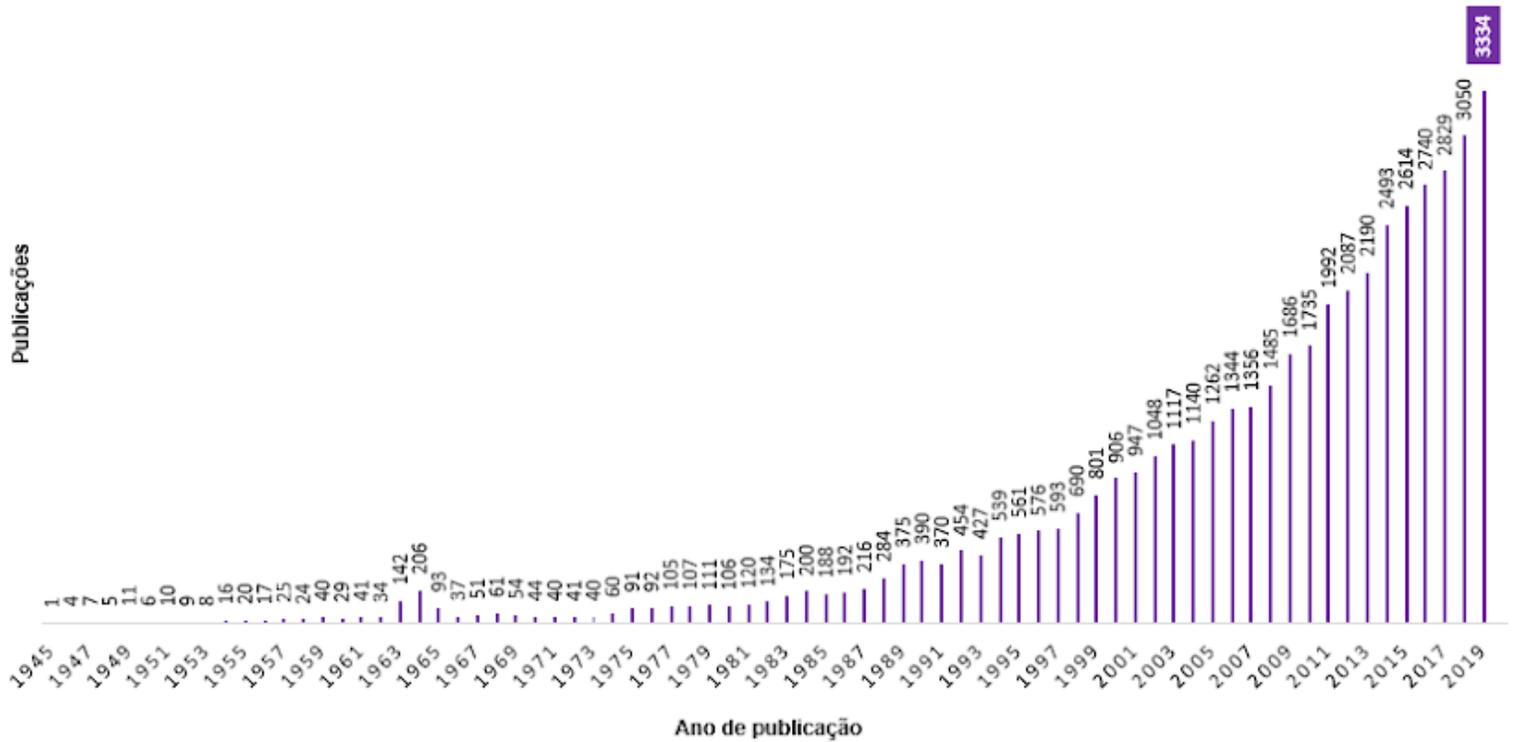


Figura 13. Estimativa de publicações sobre antifúngicos. Representação gráfica de todos os estudos sobre antifúngicos publicados até Novembro de 2019 na base de dados PubMed. A figura mostra desde a primeira publicação, em 1945, até os 3334 estudos já publicados em 2019, o conceituando com o ano com mais publicações sobre antifúngicos de toda história. A quantificação foi feita utilizando a busca avançada do PubMed utilizando o termo “*antifungal*” como termo chave, obrigatoriamente presente no título ou no *abstract* dos resultados. A intenção foi realizar uma análise prospectiva de todas as publicações sobre antifúngicos já catalogadas em uma base de dados referência (PubMed) e separá-las pelo intervalo de tempo das publicações. O gráfico foi gerado utilizando o Excel. Fonte: Autora.

E quando analisamos especificamente o cetoconazol, os 217 estudos publicados sobre cetoconazol em 2019 representam 6,51 % do total de 3334 publicações sobre antifúngicos nesse ano (Figura 13, Figura 14). Isso representa, em média, que um estudo foi publicado sobre cetoconazol na plataforma PubMed em 2019 a cada 40 horas. E a projeção para 2020 é que esse número de publicações por ano continue na tendência de crescimento linear que apresenta desde a primeira publicação sobre o fármaco antifúngico, em 1978.



Figura 14. Estimativa de publicações sobre cetoconazol. Representação gráfica de todos os estudos sobre cetoconazol publicados até Novembro de 2019 na base de dados PubMed. A figura mostra desde as duas primeiras publicações, em 1978, até os 217 estudos já publicados em 2019. O ano com mais estudos foi 2015, totalizando 245 publicações. A quantificação foi feita utilizando a busca avançada do PubMed utilizando o termo “*ketoconazole*” como termo chave, obrigatoriamente presente no título ou no *abstract* dos resultados. A intenção foi realizar uma análise prospectiva de todas as publicações sobre antifúngicos já catalogadas em uma base de dados referência (PubMed) e separá-las pelo intervalo de tempo das publicações. O gráfico foi gerado utilizando o Excel. A linha reta em branco representa a tendência linear das publicações desde 1978 até a previsão para 2020, demonstrando que além de cetoconazol ter sido um tema crescente de publicação, tende a permanecer crescendo em 2020. Fonte: Autora.

Todas essas análises bibliográficas demonstraram que os temas de estudo desse trabalho (curativos, hidrogéis, antifúngicos e cetoconazol), não só são objetos de estudo há bastante tempo (por exemplo, a primeira publicação sobre curativos data de 1889), como também demonstraram uma tendência linear de aumento ao longo dos anos até 2019. No caso de publicações sobre curativos (Figura 10), hidrogéis como curativos (Figura 11) e antifúngicos (Figura 13), todas as quantificações apresentaram 2019 como o ano com mais estudos dentre todos os registros anuais de publicações na plataforma PubMed. E mesmo quando 2019 não foi o ano com mais publicações, como no caso do cetoconazol (Figura 14), ele foi o quarto ano com mais estudos registrados na plataforma

dentre os quarenta e três anos de publicações sobre esse antifúngico; além de apresentar uma tendência linear de aumento de estudos nessas quatro décadas, com projeção para manter esse crescimento em 2020.

Não foi gerado um gráfico sobre essas análises para o termo-chave Jaburetox pois só possuem vinte publicações registradas sobre ele na plataforma PubMed até Novembro de 2019. A primeira datada de 2007, o caracterizando (MULINARI *et al.*, 2007); e a vigésima publicada em Novembro de 2019, redigindo sobre as propriedades antifúngicas e inseticidas desse peptídeo, e como lidar com seus respectivos riscos associados (SÁ *et al.*, 2019). Até Novembro de 2019, a propriedade antifúngica do Jaburetox ainda foi pouco explorada na literatura e não há nenhuma publicação formulando Jaburetox em hidrogéis ou em qualquer outra matriz curativa. Porém, nosso grupo previamente estudou a formulação de Jaburetox em *scaffolds* no estudo previamente mencionado (FRANZ, 2018). Destarte, a partir dessas análises bibliográficas, conclui-se que as temáticas de pesquisa desse trabalho representam áreas de estudo em crescimento, recentes e com grande potencial para exploração.

3.2 Atividade Antifúngica

3.2.1 Análise quantitativa das Unidades Formadoras de Colônia de *Candida albicans* em diferentes formulações de hidrogéis

Código de Cores		
 Controle de Placa	 Jaburetox 8,25 μM	 Cetoconazol 10 μg
 Branco (DMSO)	 Jaburetox 16,5 μM	 Cetoconazol 20 μg
 Controle PBS	 Jaburetox 24,75 μM	 Cetoconazol 40 μg
	 Jaburetox 33 μM	 Ceto 40 μg + Jbtx 33 μM
	 Jaburetox 33 μM Bissulfito	

Figura 15. Código de cores das legendas dos resultados. Ele será utilizado para todos os resultados das análises quantitativas de Unidades Formadoras de Colônia e do ensaio de citotoxicidade em

queratinócitos. O objetivo do código é manter um rótulo fixo de cores para legendar todas as diferentes formulações de hidrogéis.

A primeira quantificação da atividade antifúngica de Jaburetox em *C. albicans* foi bastante significativa, mesmo na menor concentração de 8,25 μM (Figura 16). Considerando que o controle PBS de fato apresentou uma referência de elevado crescimento fúngico, a diferença de formulação dos hidrogéis que continham Jaburetox de fato representou a capacidade do peptídeo em impedir a formação de colônias de *C. albicans*. Quando comparamos as três concentrações utilizadas, ainda que a formulação com Jaburetox 33 μM aparente uma atividade antifúngica maior, não há diferença estatística entre elas. Observando essa análise, pode-se inferir que mesmo a formulação com a menor concentração de Jaburetox (quatro vezes menor que a formulação de 33 μM), apresentaria uma atividade antifúngica significativa na inibição do crescimento de *C. albicans*.

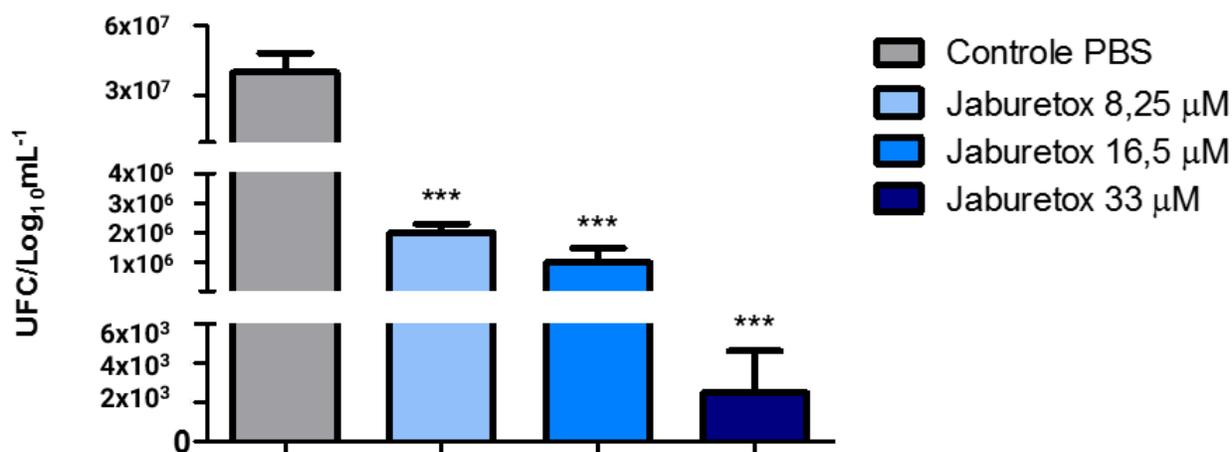


Figura 16. Atividade antifúngica de Jaburetox. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia de *Candida albicans* comparando o Controle PBS com: Jaburetox 8,25 μM , Jaburetox 16,5 μM e Jaburetox 33 μM). Foi encontrada uma significância representativa de *** entre todas essas comparações. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A legenda segue o código de cores indicado para todas análises de atividade antifúngica, especificado anteriormente.

Para a produção dos hidrogéis com diferentes formulações, utilizamos um polímero sintetizado e cedido pelo Professor Douglas Gamba do Departamento de Química Orgânica da UFRGS, o PEGm (Polietileno-glicol metacrilado) pela sua

biocompatibilidade e já reportadas utilizações biomédicas (NIELSEN *et al.*, 2017). O polímero foi utilizado em concentrações de 15 % e as únicas mudanças realizadas no processo de polimerização dos hidrogéis foram referentes aos agentes iniciadores da polimerização. O TEMED, um dos iniciadores mais comuns utilizado juntamente ao APS, apesar de eficiente, apresenta citotoxicidade em certas concentrações (AHMED *et al.*, 2014). Também há estudos demonstrando que a utilização do TEMED pode alterar a estabilidade de peptídeos e proteínas, e sugerindo a utilização de catalisadores alternativos como o bissulfito de sódio, a fim de preservar a integridade química dos peptídeos durante a polimerização da solução (SOMSEN; NOSTRUM, 2014). Dessa forma, com o intuito de minimizar os efeitos de toxicidade, ainda que mantendo a estabilidade física dos hidrogéis, também testamos a substituição do TEMED pelo bissulfito de sódio. O primeiro obstáculo dessa substituição foi observado durante a polimerização, utilizando bissulfito de sódio, que demonstrou-se até dez vezes mais lenta que utilizando o TEMED. Também observou-se que, comparados com os hidrogéis polimerizados com o sistema APS/TEMED, os hidrogéis com o sistema APS/Bissulfito de sódio eram consideravelmente mais instáveis e frágeis fisicamente, chegando a quebrar quando retirados das placas em que foram polimerizados, ou até não polimerizando por completo. Quando quantificamos a atividade antifúngica dos hidrogéis polimerizados com bissulfito de sódio, também pudemos observar uma grande variação quando comparados aos hidrogéis em que utilizamos TEMED (Figura 17). O controle PBS apresentou uma maior inibição do crescimento de *C. albicans*, e ambos os hidrogéis contendo cetoconazol e Jaburetox apresentaram maior crescimento de colônias, efeitos contrários aos desejados. Uma possível explicação para esse efeito adverso é a polimerização que ocorreu de forma mais lenta e menos eficiente. Por esse motivo, os resultados apresentados nas Figuras 17 e 18 foram os únicos em que efetuamos a substituição do sistema de iniciação APS/TEMED pelo sistema APS/Bissulfito de sódio durante o processo de produção dos hidrogéis.

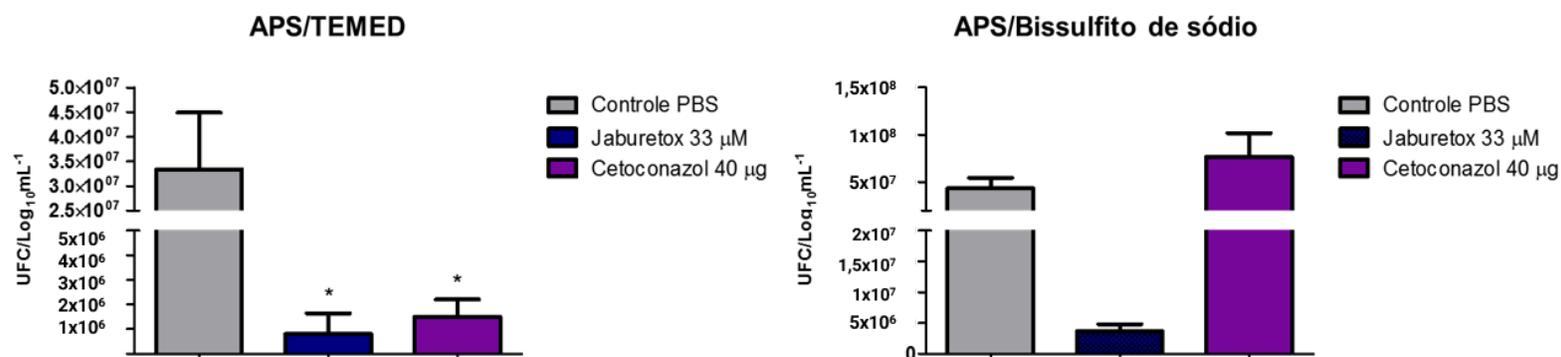


Figura 17. Atividade antifúngica comparativa entre hidrogéis polimerizados com TEMED ou com Bissulfito de sódio. Os hidrogéis foram formulados com Jaburetox 33 µM ou cetonazol, e polimerizados ou com TEMED ou com Bissulfito de sódio. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia de *Candida albicans* comparando o Controle PBS com: Jaburetox 33 µM e Cetonazol 40 µg. Foi encontrada uma significância de * somente nas comparações dos hidrogéis polimerizados com TEMED. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A legenda segue o código de cores indicado para todas análises de atividade antifúngica, especificado anteriormente.

Como esse trabalho busca por um sistema bioativo que seja o mais biocompatível possível, além de testar a substituição de TEMED por um catalisador alternativo, também testamos dialisar ambos os sistemas com PBS a fim de minimizar os efeitos tóxicos possíveis das soluções dos hidrogéis formulados com Jaburetox. Porém, como podemos observar na Figura 18, em ambos os hidrogéis polimerizados com TEMED ou Bissulfito de sódio, não há atividade antifúngica, não apresentando diferença estatística em relação ao controle PBS. A provável causa da diminuição foi a lixiviação do peptídeo devido à permeabilidade do hidrogel, que sofre intumescimento em contato com a solução. Isso fica mais nítido quando observamos a não-significância entre os resultados da Figura 18, o que é coerente, já que foram dialisados sob a mesma solução salina base do Controle (PBS). Assim, notamos que o processo de diálise não faria sentido no contexto da produção dos nossos hidrogéis, já que resultaria na dissolução e perda das formulações bioativas, e conseqüente perda de suas atividades antifúngicas anteriormente observadas (Figura 16). Uma alternativa seria liofilizar os hidrogéis e hidratá-los na solução contendo o peptídeo, porém a liofilização muitas vezes leva à quebra dos hidrogéis.

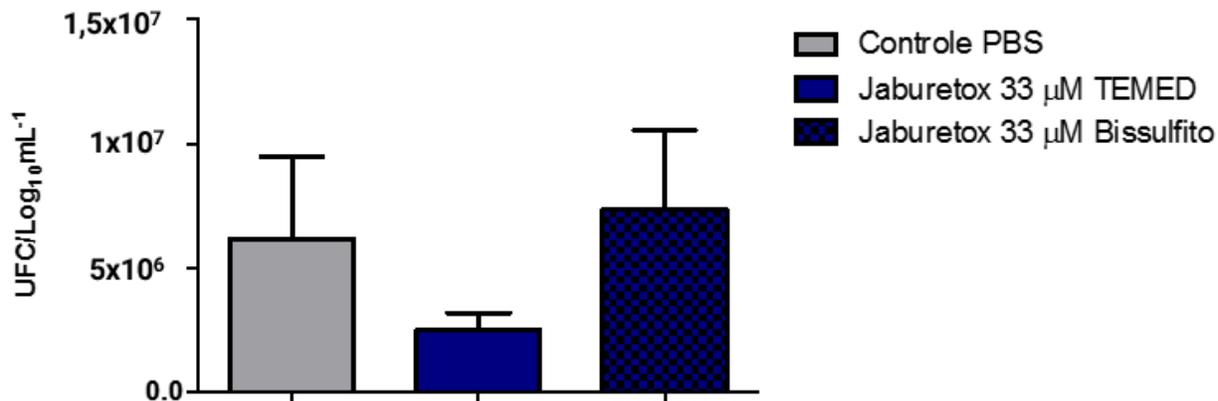


Figura 18. Atividade antifúngica de Jaburetox após diálise. Análise de hidrogéis formulados com Jaburetox 33 µM e polimerizados ou com TEMED ou com Bissulfito de sódio. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia de *Candida albicans* comparando o Controle PBS (polimerizado com TEMED) com: Jaburetox 33 µM polimerizado com TEMED e Jaburetox 33 µM. Não foi encontrada significância entre nenhuma das comparações. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A legenda segue o código de cores indicado para todas análises de atividade antifúngica, especificado anteriormente.

Observamos também que, quando os hidrogéis formulados com cetoconazol eram esterilizados por UV, mesmo que em intervalos de 15 minutos a cada lado, a atividade antifúngica desses hidrogéis ficava comprometida (Figura 19). Esse fenômeno pode ser explicado porque o UV pode degradar alguns fármacos, ou ativar a sua liberação e regulação, sendo inclusive utilizado em sistemas fotodinâmicos modernos como mecanismo foto-responsivo para entrega de alguns fármacos (LIU *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2019). Por essa razão, visando evitar a lixiviação (por diálise) ou degradação (por radiação UV) de Jaburetox e cetoconazol, concluímos que o método de esterilização por filtros de 0,22 µm é o mais seguro e estável para a produção dos hidrogéis formulados.

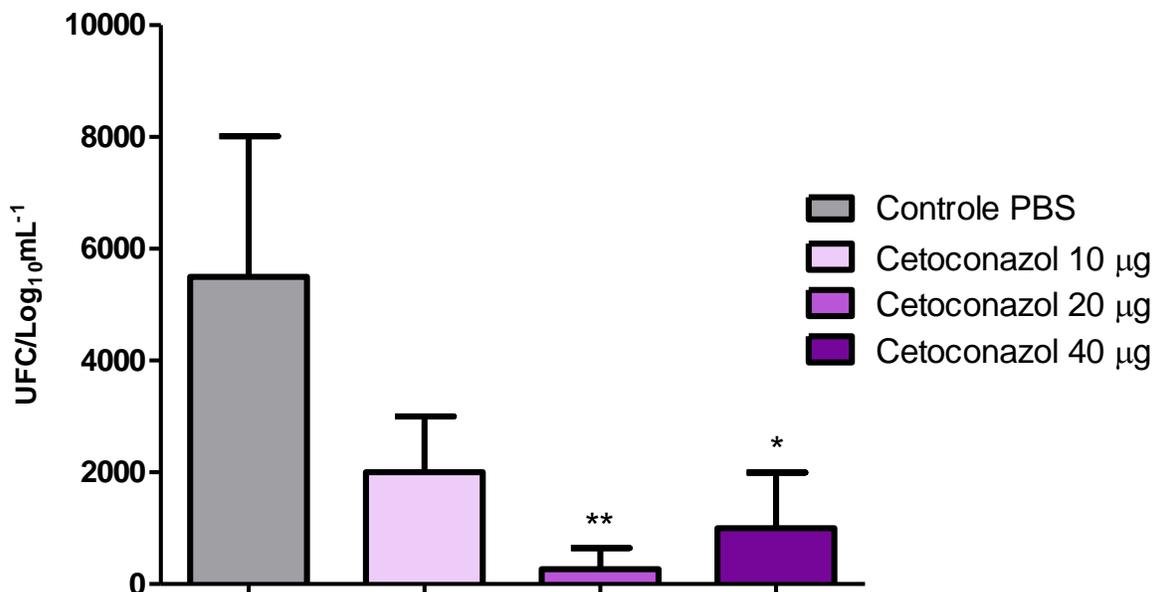


Figura 19. Atividade antifúngica de cetoconazol submetido à esterilização por UV. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia de *Candida albicans* comparando o Controle PBS com: Cetoconazol 10 µg, Cetoconazol 20 µg e Cetoconazol 40 µg), em que todos os hidrogéis foram esterilizados por radiação UV, a 15 minutos cada lado. Foi encontrada uma significância representativa de ** entre PBS e cetoconazol 20 µg, de * com cetoconazol a 40 µg e sem nenhuma significância a 10 µg. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A legenda segue o código de cores indicado para todas análises de atividade antifúngica, especificado anteriormente.

Outro polipeptídeo derivado de urease - nesse caso, de soja (*Glycine max*) - chamado de Soyuretox já foi descrito como sendo fungitóxico à *C. albicans* a uma concentração mínima de 5 µM (KAPPAUN *et al.*, 2019). Diferente de Soyuretox, ainda não há na literatura uma concentração mínima para a atividade antifúngica de Jaburetox em *C. albicans*. Reconhecendo a falta da descrição de uma concentração fungitóxica mínima para Jbtx em *C. albicans* e observando que os hidrogéis formulados com Jaburetox primeiramente apresentaram atividades antifúngicas significativas (Figura 16), decidimos realizar uma análise incluindo duas novas formulações: 1) uma concentração de Jaburetox intermediária de 24,75 µM; 2) uma formulação contendo ambos Jaburetox 33 µM e Cetoconazol 40 µg. Podemos notar que a atividade antifúngica de todas as concentrações de Jaburetox mostrou-se não significativa (Figura 20) quando comparada à primeira análise (Figura 16). Já ambas formulações contendo o fármaco antifúngico cetoconazol demonstraram atividade antifúngica estatisticamente significativa: a

significância da formulação de Cetoconazol 40 µg + Jaburetox 33 µM deve-se provavelmente à atividade antifúngica do cetoconazol. Observa-se isso pois, em vista que as análises estatísticas não demonstraram diferença significativa entre a formulação somente com cetonazol e a formulação com a adição de Jaburetox, mas demonstraram diferença significativa entre ambas as formulações contendo cetonazol e a formulação contendo a maior concentração de Jaburetox.

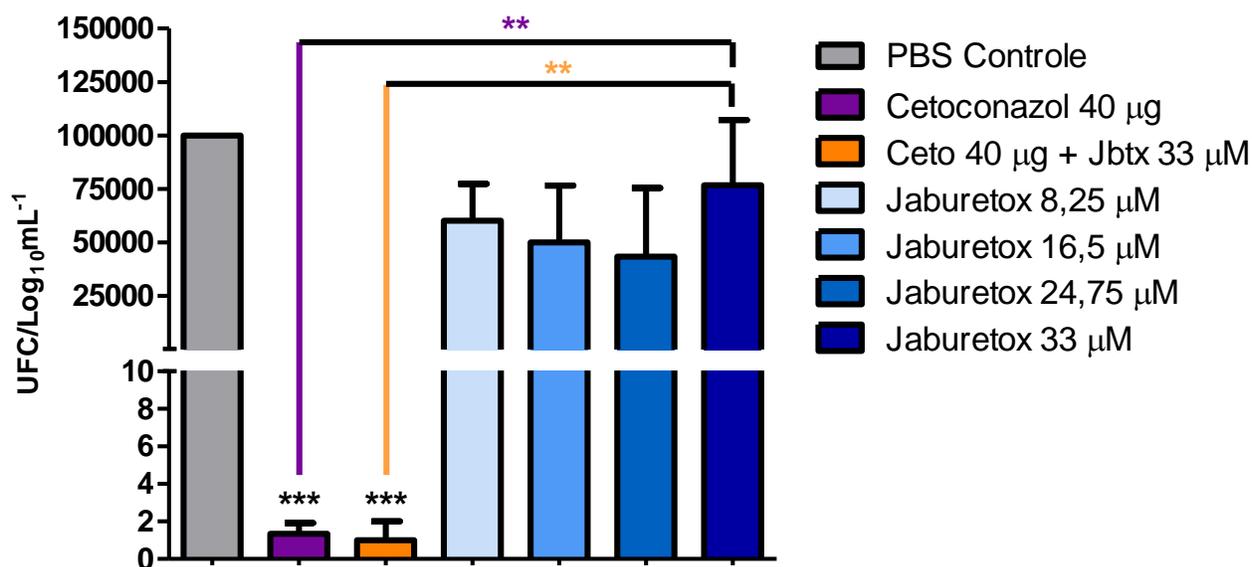


Figura 20. Atividade antifúngica de Cetoconazol e Jaburetox. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia de *Candida albicans* comparando o Controle PBS com: Cetoconazol 40 µg (significância: ***), Cetoconazol 40 µg + Jbtx 33 µM (significância: ***), Jaburetox 8,25 µM, Jaburetox 16,5 µM, Jaburetox 24,75 µM, Jaburetox 33 µM). Também foi encontrado significância entre Cetoconazol 40 µg e Jaburetox 33 µM (significância: **) e entre Cetoconazol 40 µg + Jbtx 33 µM e entre Jaburetox 33 µM. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A legenda segue o código de cores indicado para todas análises de atividade antifúngica, indicado anteriormente.

Considerando a dificuldade do processo de produção, purificação e concentração do peptídeo Jbtx (o que tornaria o processo de produção dos hidrogéis mais caro e menos acessível, além de mais demorado); e a observação de que a quanto maior o intervalo de tempo entre a polimerização e a análise da atividade antifúngica desses hidrogéis, maior a instabilidade da atividade antifúngica do Jbtx nessa formulação, resolvemos avaliar a atividade antifúngica contra *C. albicans* de hidrogéis de PEG-met

formulados com diferentes doses de cetoconazol (10 µg, 20 µg e 40 µg), dado ainda não encontrado na literatura. Observando as Figuras 21 e 22, notamos que, mesmo com grandes desvios padrões e variação entre as replicatas biológicas, no geral, os hidrogéis formulados com cetoconazol apresentaram atividade antifúngica significativa contra *C. albicans* mesmo na menor dose testada, de 10 µg. Quando consideramos os hidrogéis Controle PBS como 100 % de viabilidade e quantificamos a viabilidade de *C. albicans* em cada formulação de cetoconazol, observamos que todas as formulações resultam em baixa viabilidade celular (Figura 22). A menor viabilidade média foi a da formulação contendo Cetoconazol 20 µg, apresentando 5,85 % de viabilidade. Logo atrás, a formulação contendo 10 µg de cetonazol (Viabilidade média de 8,37 %) e por último, ainda que significativa, a formulação contendo 40 µg de cetoconazol (Viabilidade média de 10,74 %)

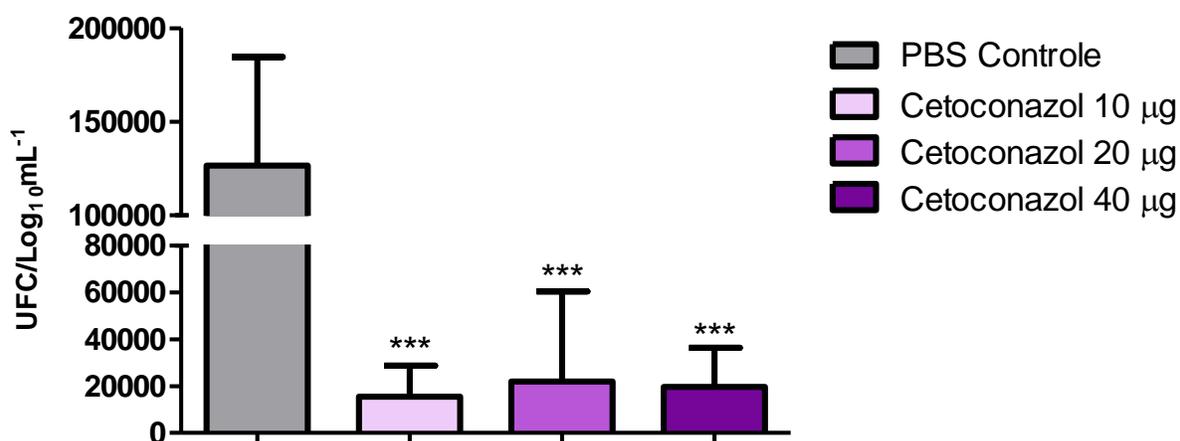


Figura 21. Atividade antifúngica de cetoconazol. Quantificação de Unidades Formadoras de Colônia de *Candida albicans* comparando o Controle PBS com: Cetoconazol 10 µg, Cetoconazol 20 µg e Cetoconazol 40 µg). Foi encontrada uma significância representativa de *** entre todas essas comparações. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A legenda segue o código de cores indicado para todas análises de atividade antifúngica, especificado anteriormente.

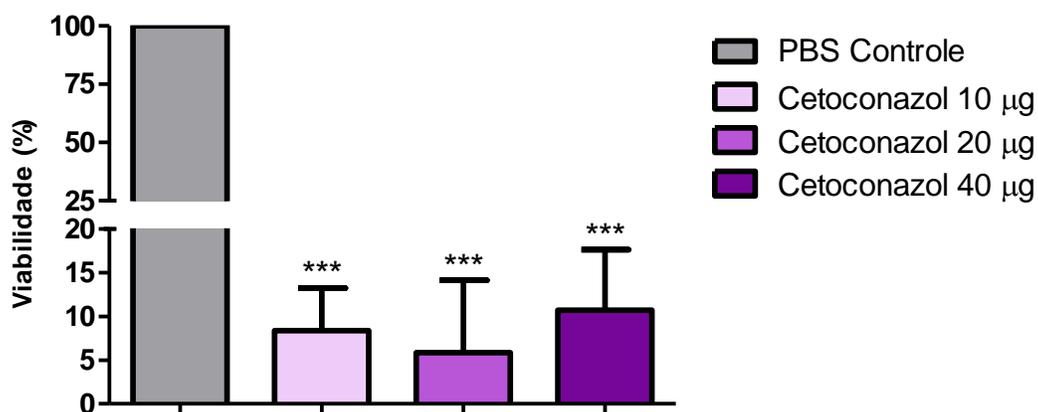


Figura 22. Viabilidade de *C. albicans* em hidrogéis contendo cetozonazol. Quantificação da viabilidade de colônias *Candida albicans* em que o Controle PBS representa uma viabilidade de 100 %. Comparou-se o controle PBS com Cetozonazol 10 µg (Viabilidade média: 8.37 %), Cetozonazol 20 µg (Viabilidade média: 5.85 %) e Cetozonazol 40 µg (Viabilidade média: 10.74 %). Foi encontrada uma significância representativa de *** entre todas essas comparações. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo. A legenda segue o código de cores indicado para todas análises de atividade antifúngica, especificado anteriormente.

3.2.2 Análise qualitativa da atividade antifúngica de hidrogéis formulados com cetozonazol em *C. albicans*

Realizamos uma análise qualitativa (Figura 23) para observar como os hidrogéis formulados com cetozonazol impediram o crescimento de *C. albicans*. Os hidrogéis foram formulados com concentrações crescentes de cetozonazol e comparados com o controle. As fotos foram realizadas após 24 h em contato com os hidrogéis em placa de ágar sabouraud, a fim de comparar o padrão de formação de colônias de *C. albicans* nas diferentes formulações de hidrogéis. Pode-se observar que os quatro hidrogéis formulados sem a presença de cetozonazol, ou seja, somente com PBS, apresentam uma grande densidade de *C. albicans* abaixo da superfície do hidrogel. Também observa-se uma grande quantidade de colônias nas áreas tangentes aos hidrogéis. Nas frações da placa com os hidrogéis formulados com 10 µg e 20 µg de cetozonazol, ainda observa-se uma grande quantidade de colônias de *C. albicans*, mas em uma densidade menor: nas regiões recobertas pelos hidrogéis, mesmo que inconstante dentre as replicatas, observa-se uma menor quantidade de colônias na área em volta dos

hidrogéis. Nos hidrogéis formulados com 40 µg de cetoconazol, pode-se observar uma presença menor de colônias fúngicas quando comparada com a placa contendo os hidrogéis controle. As placas foram produzidas e monitoradas sob as mesmas condições e essa é uma figura representativa e com intuito qualitativo. Apesar das diferenças apontadas dentre as diferentes formulações, ainda há uma presença exacerbada de colônias fúngicas em todas as condições. Isso pode ser explicado pois os hidrogéis foram retirados da suspensão fúngica de 2 mL de caldo sabouraud contendo 10^4 e diretamente posicionados nas placas de ágar sabouraud - um meio rico em nutrientes para tal levedura - e fotografados após 24 h, para serem avaliados comparativamente com o método de *Drop Plate*, também contabilizado após 24 h. Provavelmente, com um monitoramento entre intervalos mais curtos e com uma lavagem dos hidrogéis após retirados da suspensão, essa quantidade de colônias seria significativamente menor e as diferenças dentre as condições, mais claras.

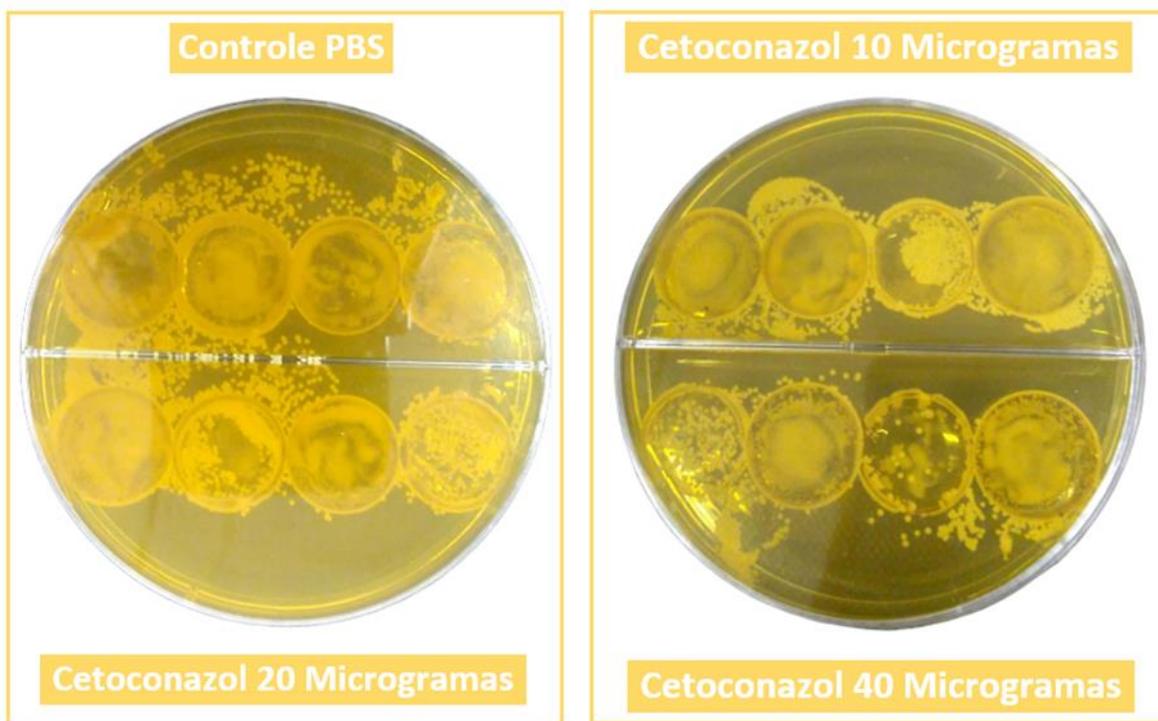


Figura 23. Atividade antifúngica qualitativa de cetoconazol. No retângulo representado na esquerda, uma placa de ágar sabouraud com divisão ao meio na qual: na parte superior, observa-se a quadruplicata de hidrogéis formulados com PBS; e na parte inferior, a quadruplicata de hidrogéis formulados com cetoconazol 20 µg. No retângulo representado na direita, outra placa de ágar sabouraud com divisão ao

meio: representando os hidrogéis formulados com cetoconazol 10 µg na parte superior; e os formulados com cetoconazol 40 µg na fração inferior. Fonte: Autora.

3.3 Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos (HaCaT) humanos

Compreendendo que a aplicação futura dessas diferentes formulações de hidrogéis seria como curativos bioativos, faz-se necessária uma avaliação da biocompatibilidade desses hidrogéis em queratinócitos humanos. Por isso, testamos a citotoxicidade de diferentes formulações de hidrogel através do teste utilizando o reagente MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) (Figura 24). O ensaio de MTT é um método colorimétrico muito utilizado para se mensurar viabilidade celular e citotoxicidade de fármacos, inclusive sendo considerado por alguns pesquisadores como o padrão ouro para ensaios de citotoxicidade (TONDER; JOUBERT; CROMARTY, 2015). Porém, como se trata de um teste metabólico, ele pode sofrer interferências devido a uma variada série de fatores energéticos e metabólicos, como mudança nas atividades de oxirredutases, e endo- e exocitose no fluxo intracelular. Essas perturbações podem resultar em sub- ou superestimações da viabilidade celular pelo ensaio de MTT, devido a adaptações metabólicas e mitocondriais de reprogramação das células quando submetidas a tratamentos por fármacos e a consequentes estresses *off-target* resultantes do tratamento durante o próprio ensaio MTT (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). Dessa forma, apesar de ser um teste padrão para avaliar a viabilidade celular, esses efeitos adversos podem indicar valores falsos positivos ou falsos negativos. Utilizamos o ensaio de MTT para testar a viabilidade dos queratinócitos expostos aos hidrogéis por ser o teste mais acessível e o disponibilizado para ser feito com as células HaCaT. Porém, os resultados dos testes de MTT indicaram todas as formulações de hidrogéis (inclusive o controle PBS) significativamente citotóxicos quando comparados ao controle de placa (Figura 24). Quanto menor a leitura de absorbância, menor a atividade metabólica das mitocôndrias expostas ao reagente, indicando uma menor viabilidade celular sob aquelas condições.

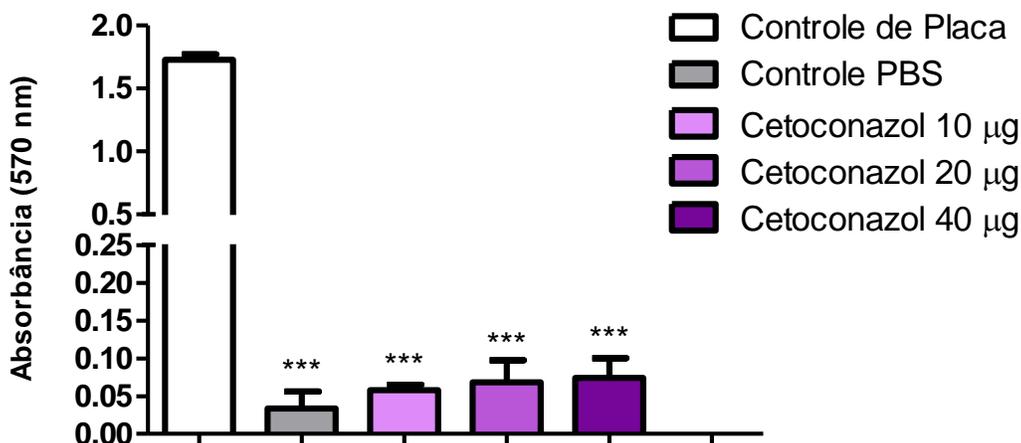


Figura 24. Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos. O ensaio foi realizado em queratinócitos (HaCaT) humanos por MTT em hidrogéis formulados com cetoconazol. A absorbância foi lida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 570 nm. A comparação dos hidrogéis com controle PBS e de todas as doses de cetoconazol contra o controle de placa apresentaram uma significância de (***). Um $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Esse resultado indica que os hidrogéis formulados não seriam biocompatíveis. Porém, apesar de ser um indicativo importante sobre a citotoxicidade dessas formulações, como dito antes, o ensaio por MTT já é descrito por apresentar resultados duvidosos e limitações. Inclusive, para evitar resultados irreais, autores como o já citado aqui Stapanenko indicam a suplementação dos ensaios baseados no sal de tetrazólio (MTT) com outros ensaios não-metabólicos, a fim de visualizar uma análise crítica e comparativa dos resultados pelo ensaio de MTT, não sustentáveis isoladamente (VIGNADUZZO, 2019). Sabendo dessas limitações, reagentes como TEMED e DMSO, presentes na formulação dos hidrogéis contendo cetoconazol também podem ter interferido na avaliação de citotoxicidade. Dessa forma, uma alternativa seria, antes de realizar outros testes não-metabólicos suplementares ao ensaio de MTT, alterar as formulações para utilizar as concentrações mínimas necessárias de APS, TEMED e DMSO que ainda dissolvam o cetoconazol e polimerizem os hidrogéis de forma eficiente. Além disso, também seria interessante investir em um método de incorporação do fármaco que permitisse a diálise prévia, para realizar a retirada do excesso de reagentes que não foram polimerizados.

4. Conclusão e Perspectivas

Com base em todos os resultados observados, pode-se concluir que hidrogéis formulados com Jaburetox ou cetoconazol apresentam uma promissora e significativa atividade antifúngica contra *C. albicans*, apesar da instabilidade, principalmente do peptídeo. Observou-se também que há cada vez mais publicações abordando os temas-chave desse trabalho, como curativos, hidrogéis, antifúngicos e cetoconazol, demonstrando a atualidade e relevância da relação entre eles como tema de pesquisa. Notou-se também que adaptações de formulação são necessárias para diminuir a citotoxicidade em todos os hidrogéis; e para aumentar, assim, a sua biocompatibilidade, permitindo a aplicação final dos mesmos como curativos bioativos. Também são necessários testes quantitativos sobre a estabilidade e capacidade adsorptiva desses hidrogéis, propriedades relevantes para possibilitar sua aplicação como curativos bioativos eficientes. Resultados preliminares ainda inconclusivos, também realizados durante esse trabalho, avaliando a atividade antifúngica de hidrogéis formulados com cetoconazol em *C. albicans* formadora de biofilme também representam um caminho necessário, além de analisar a atividade antifúngica dessas formulações em outras linhagens (por exemplo, isolados clínicos) e espécies fúngicas. Outros ensaios de quantificação antimicrobiana, como a análise da atividade antibacteriana em espécies como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizando os hidrogéis formulados com Jaburetox, também seriam de suma importância, visto que a atividade antibacteriana deste peptídeo formulada em hidrogéis ainda não foi explorada na literatura. Essas análises são de grande interesse, visando a aplicação curativa desses hidrogéis bioativos contra um espectro amplo de micro-organismos. Destarte, há diversas perspectivas factíveis para tornar os dados desse trabalho mais críticos, coerentes e robustos, sendo visível a necessidade de diversos estudos e análises adicionais até a possibilidade da aplicação desses hidrogéis como curativos. Porém, também é visível o potencial bioativo dessas formulações em hidrogéis. Dessa forma, apesar de alcançados os objetivos propostos nesse trabalho, é reconhecível o extenso caminho até sua finalidade ideal; e por isso, a maior conclusão que posso observar é: a busca deve continuar.

5. Referências Bibliográficas

AHMED, Mushtaq *et al.* Toxicological effect of N, N, N, N -tetramethylethylene on rat brain acetylcholinesterase. **Toxicological and Industrial Health**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 415–420, 2014.

BECKER-RITT, Arlete Beatriz; PORTUGAL, Camila Saretta; CARLINI, Célia Regina. Jaburetox: Update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–8, 2017.

BOATENG, Joshua S. *et al.* Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 97, n. 8, p. 2892–2923, 2008.

BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 254, p. 248–254, 1976.

BROLL, Valquiria *et al.* Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 159, p. 849–860, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.053>>

BROWN, Matthew S.; ASHLEY, Brandon; KOH, Ahyeon. Wearable Technology for Chronic Wound Monitoring: Current Dressings, Advancements, and Future Prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 6, n. April, p. 1–21, 2018.

CARVALHO, Isadora C. *et al.* 3D sponges of chemically functionalized chitosan for potential environmental pollution remediation: biosorbents for anionic dye adsorption and ‘antibiotic-free’ antibacterial activity. **Environmental Technology**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–21, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1689302>>

CAVANAGH, H. Dwight; BODNER, Bruce I.; WILSON, Louis A. Extended Wear Hydrogel Lenses Long-Term Effectiveness and Costs. **Ophthalmology**, [s. l.], v. 87, n. 9, p. 871–876, [s.d.]. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(80\)35153-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(80)35153-1)>

CHILDS, Andre *et al.* Fabricating customized hydrogel contact lens. **Nature Publishing Group**, [s. l.], n. October, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep34905>>

D, Choi Franchesca; LW, Juhasz Margit; NATASHA, Atanaskova Mesinkovska. **Journal**

of Dermatological Treatment, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 000, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09546634.2019.1573309>>

DANIELE, Salvatore *et al.* Glyceryl Methacrylate Hydrogel as a Vitreous Implant. **Archives of Ophthalmology**, [s. l.], v. d, 1968.

DAROUIE, Sheyda *et al.* The fate of mesenchymal stem cells is greatly influenced by the surface chemistry of silica nanoparticles in 3D hydrogel-based culture systems. **Material Sciences and Engineering**, [s.l.]: Elsevier B.V., 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110259>>

DHIVYA, Selvaraj; VIJAYA, Viswanadha; SANTHINI, Elango. Wound dressings – a review. **BioMedicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 24–28, 2015.

DOU, Yuanyuan *et al.* Artificial spider silk from ion-doped and twisted core-sheath hydrogel fibres. **Nature Communications**, [s. l.], n. 2019, p. 1–10, [s.d.].

ENOCH, Stuart *et al.* Wound assessment. **British Medical Journal**, [s. l.], n. March, 2006.

FERREIRA-DASILVA, Cláudio & Gombarovits, Maria & Masuda, Hatisaburo & Oliveira, Cátia & Carlini, Célia. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect Cathepsin-like enzymes. **Insect biochemistry and physiology**. 44. 162-71, 2000.

FRANZ, Michael G. Current Problems in Surgery. **Journal of Surgery**, [s. l.], v. 38, n. 2, 2001.

GOU, Maling *et al.* Bio-inspired detoxification using 3D-printed hydrogel nanocomposites. **Nature Communications**, [s. l.], v. 5, n. May, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4774>>

FRANZ, Lucas *et al.* Produção em Escala Piloto da Proteína Recombinante Jaburetox e Desenvolvimento de Curativos Bioativos a partir de Matrizes de Poli(ácido láctico) e Jaburetox. 2018. A partir de 2020 estará disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/>

GREISER, Udo *et al.* A hybrid injectable hydrogel from hyperbranched PEG macromer as a stem cell delivery and retention platform for diabetic wound healing. **Acta Biomaterialia**, [s.l.], 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.05.039>>

GUPTA, Aditya K.; LYONS, Danika C. A. The Rise and Fall of Oral Ketoconazole. [s. l.], 2015.

KAMOUN, Elbadawy A.; KENAWY, El-refaie S.; CHEN, Xin. A review on polymeric

hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 217–233, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>>

KAPPAUN, Karine *et al.* Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. **Journal of Advanced Research**, [s. l.], v. 13, p. 3–17, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>>

KATAOKA, Makoto *et al.* *In Vitro* Assessment of Supersaturation/Precipitation and Biological Membrane Permeation of Poorly Water-Soluble Drugs: A Case Study With Albendazole and Ketoconazole. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 108, p. 2580–2587, 2019.

KNAPP, U; RAHN, HD; SCHAUWECKER, F. Clinical experiences with a new gel-like wound dressing after skin transplantation. **Aktuelle Traumatology**, [s. l.], p. 275-281, 1984.

KRAJEWSKA, Barbara. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [s. l.], v. 59, p. 9–21, 2009.

LEVINE, H. B.; COBB, J. M. Oral Therapy for Experimental Coccidioidomycosis with R41400 (Ketoconazole), a New Imidazole. **The American Review of Respiratory Disease**, [s. l.], v. 118, n. 8 mm, p. 715–721, 1978.

LIU, Lan-tao *et al.* An NIR-light-responsive surface molecularly imprinted polymer for photoregulated drug release in aqueous solution through porcine tissue. **Materials Science & Engineering C**, [s. l.], v. 106, n. December 2018, p. 110253, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110253>>

LIU, Xinyue *et al.* Ingestible hydrogel device. **Nature Communications**, [s. l.], n. 2019, [s.d.]. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08355-2>>

LLOYD, Jordan. Injured surgical. **The Hospital of London**, [s. l.], 1889. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5196975/>>

LOPES, Fernanda C. *et al.* Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. **The FEBS Journal**, [s. l.], v. 282, n. 6, p. 1043–1064, 2015.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [s. l.], 2004.

MANDLA, Serena; HUYER, Davenport; RADISIC, Milica. Review: Multimodal bioactive material approaches for wound healing. **APL Bioengineering**, [s. l.], v. 021503, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.5026773>>

MAURI, Emanuele *et al.* Ester coupling of ibuprofen in hydrogel matrix: a facile one-step strategy for controlled anti-inflammatory drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.002>>

MOBLEY, H. L.; HAUSINGER, R. P. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. **Microbiological reviews**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 85–108, 1989.

MOSTAFALU, Pooria *et al.* Smart Bandage for Monitoring and Treatment of Chronic Wounds. [s. l.], v. 1703509, p. 1–9, 2018.

MULINARI, F. *et al.* Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 2042–50, 2007.

NEGUT, Irina; GRUMEZESCU, Valentina; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Treatment Strategies for Infected Wounds. **Molecules**, [s. l.], p. 1–23, 2018.

NIELSEN, Josefine Eilsø *et al.* Structural and Rheological Properties of Temperature-Responsive Amphiphilic Triblock Copolymers in Aqueous Media Structural and Rheological Properties of Temperature. **Journal of Physical Chemistry**, [s. l.], 2017.

PIOVESAN, Angela R. *et al.* *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 547, p. 6–17, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.02.006>>

POSTAL, Melissa *et al.* Peptides Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010>>

QU, Jin *et al.* Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. **Biomaterials**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.044>>

RADHAKUMARY, C.; ANTONY, Molly; SREENIVASAN, K. Drug loaded

thermoreponsive and cytocompatible chitosan based hydrogel as a potential wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 83, n. 2, p. 705–713, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.042>>

SÁ, Chayenne Alves *et al.* Risk assessment of the antifungal and insecticidal peptide Jaburetox and its parental protein the Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], p. 110977, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110977>>

SARABAH, Sujata *et al.* Recent advances in topical wound care. **Indian Journal of Plastic Surgery**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 379–387, 2012.

SILVA, Douglas *et al.* Jaburetox, a natural insecticide derived from Jack Bean Urease, activates voltage-gated sodium channels to modulate insect behavior. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 153, n. November 2018, p. 67–76, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.11.003>>

SIMÕES, Déborah *et al.* Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 127, n. December 2017, p. 130–141, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>>

SOMSEN, Govert W.; NOSTRUM, Cornelus F. Van. Methylenation of peptides by N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED) under conditions used for free radical polymerization: a mechanistic study. **Bioconjugate Chemistry**, [s. l.], 2014.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. NU SC. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. Department of Biosynthesis of Nucleic Acids, Institute of Molecular Biology and Genetics. **Gene**, [s. l.], 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>>

SU, Alison *et al.* *In situ* measurement of thermodynamic partitioning in open hydrogels. [s. l.], 2019.

TONDER, Alet Van; JOUBERT, Annie M.; CROMARTY, A. Duncan. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. **Biomedical Central Research Notes**, [s. l.], p. 1–10, 2015.

UZUN, Muhammet. A review of wound management materials. [s. l.], v. 4, n. 1, p. 53–59,

2018.

VIGNADUZZO, Silvana E. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. [s. l.], 2019.

WITTE, Maria B.; BARBUL, Adrian. General Principles of Wound Healing. **Surgical Clinics of North America**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.

WONG, Victor W.; GURTNER, Geoffrey C. Tissue engineering for the management of chronic wounds: current concepts and future perspectives. **Experimental Dermatology**, [s. l.], p. 729–734, 2012.

YAN, Jiang Ying *et al.* Ketoconazole Associated Hepatotoxicity: A Systematic Review and Meta-analysis. **Biomedical and Environmental Sciences**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 605–610, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3967/0895-3988.2013.07.013>>

YATES, D. W.; HADFIELD, J. M. Clinical experience wound dressing with a new hydrogel. **International Journal of the Care of the Injured**, [s. l.], p. 23–24, 1984.

ZHANG, Yunfan *et al.* A Tetra-PEG Hydrogel Based Aspirin Sustained Release System Exerts Beneficial Effects on Periodontal Ligament Stem Cells Mediated Bone Regeneration. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 2019.

ZHAO, Xin *et al.* Biomaterials Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self- healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. **Biomaterials**, [s. l.], v. 122, p. 34–47, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.011>>