



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO - CTC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS - EQA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIAS INTEGRADAS - InteLab

Taisa Regina Stumpf da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE CELULOSE
BACTERIANA PARA CULTURA DE CÉLULAS E
PERMEAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

Florianópolis / SC
2012

Taisa Regina Stumpf da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE CELULOSE
BACTERIANA PARA CULTURA DE CÉLULAS E
PERMEÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Coorientadora: Dra. Renata Aparecida Nedel Pértile

Florianópolis - SC
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

da Silva, Taisa Regina Stumpf
DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA PARA
CULTURA DE CÉLULAS E PERMEACÃO DE BIOMOLÉCULAS [dissertação]
/ Taisa Regina Stumpf da Silva ; orientador, Luismar
Marques Porto ; co-orientadora, Renata Aparecida Nedel
Pértile. - Florianópolis, SC, 2013.
140 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Celulose Bacteriana. 3.
Scaffold Multicompartimentalizado. 4. Cultura de Célula.
5. Engenharia Tecidual. I. Porto, Luismar Marques. II.
Pértile, Renata Aparecida Nedel. III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

Taisa Regina Stumpf da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE CELULOSE
BACTERIANA PARA CULTURA DE CÉLULAS E
PERMEAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de
Mestre em Engenharia Química e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 18 de dezembro de 2012

Prof. Dr. Ricardo Antônio Francisco Machado
Coordenador do PosENQ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Presidente

Profa. Dra. Ana Paula Testa
Pezzin
Membro Externo - UNIVILLE

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Membro Interno -
PosENQ/UFSC

Dra. Fernanda Vieira Berti
Membro Participante –
PosENQ/UFSC

Dra. Daliana Müller
Membro Externo -
PGMAT/UFSC

Dedico este trabalho à minha família (Cladis, Roberto, Marcos e Dayhane) e ao meu marido (Danilo), pois sem eles nada disso seria possível e/ou faria sentido.

AGRADECIMENTOS

Encontrar as palavras certas, agradecer de forma justa e adequada às pessoas especiais que fazem parte da minha vida, sem as quais eu jamais teria conseguido chegar até aqui, não é algo simples. Porém, através desta página simbólica, deixo registrado o meu profundo agradecimento:

- Aos meus pais, Cladis e Roberto, meus espelhos, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, que souberam dizer não nas horas certas e que apesar da distância estiveram mais presentes do que nunca. Ao meu irmão, Marcos, e à minha cunhada, Dayhane, pelo amor e carinho.
- Ao meu marido, amigo e cúmplice, Danilo H. da Silva, pela paciência, parceria, mas principalmente pelo amor incondicional, o qual me deu forças para continuar.
- Ao professor Dr. Luismar Marques Porto, pela amizade e orientação.
- À Dra. Renata A. N. Pértile, pela coorientação e pelos ensinamentos.
- Aos amigos do laboratório, que contribuíram na realização deste trabalho, pela amizade e compreensão: Dr. Carlos R. Rambo, Dra. Fernanda V. Berti, Julia de V. Castro, Edroaldo L. da Rocha, Tatiane R. Cardozo, Charles Kondageski, Joanna F. Godinho, Lya Piaia, Guilherme Colla, Samara S. de Souza, Ericka C. y Perez, Jéssica B. Cruz, João C. S. Lobe, Beatriz da R. Espíndola, Camila Schroeder, Fernanda P. Rotunno e Tuane C. Antonio.
- A todos os meus amigos, que tornam os meus dias mais alegres e minha caminhada mais prazerosa e cheia de sorrisos.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química da UFSC.
- À professora Cíntia Soares e à aluna Adrieli Dal'Toé pela sua contribuição nos estudos de modelagem matemática e simulação numérica.
- À Daliana Müller, Danilo H. da Silva, Felipe Cassine, Geneviève K. Pinheiro e Justino que de alguma forma me auxiliaram na realização das análises de IV, TGA, BET, ponto crítico e liofilização, respectivamente.
- Ao CEOESP (São Miguel do Oeste, SC), principalmente ao Dr. Marcos Giovanetti, pelas análises de MEV.
- Ao CNPq, CAPES e FINEP, pelo suporte financeiro.
- À banca examinadora pelas dicas e correções.
- A Deus.

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida. Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.” (Augusto Cury)

“Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...” (Nemo Nox)

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA PARA CULTURA DE CÉLULAS E PERMEAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) secretada por bactérias como a *Gluconacetobacter hansenii* é composta por uma rede de nanofibras de celulose que apresenta como principais características a moldabilidade e a biocompatibilidade. Apesar das excelentes características deste biomaterial, pode-se ainda alterar tanto suas propriedades físico-químicas como sua forma de estruturação, para se obter um material diferenciado. As modificações estruturais da CB podem ser realizadas por meio da combinação da CB com outros compostos *in situ* e as modificações morfológicas podem ser realizadas pela fermentação da CB em diferentes recipientes com diferentes metodologias, estendendo assim sua área de aplicação. Esta dissertação está dividida em duas partes, na primeira foram produzidas e caracterizadas membranas de CB modificadas *in situ* com a adição de glicose ou dextrina ao meio de cultura contendo manitol, em cultura estática (CBGI e CBDe, respectivamente). As imagens de MEV mostraram que houve modificações na rede de fibras das membranas. Ambas as modificações diminuíram a área superficial específica, a capacidade de retenção de água (CRA) e a taxa de reidratação (TR). Já os resultados da espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR) revelaram que não houve nenhuma alteração na estrutura química da CB. A modificação com a adição de glicose no meio de cultura (CBGI) influenciou positivamente o comportamento dos fibroblastos, aumentando a adesão e a proliferação celular quando comparado com o controle (CBC). Na segunda parte foi desenvolvida uma plataforma 3D multicompartimentalizada de CB (CM^{3D}). Por meio da sementeira de fibroblastos no interior da matriz compartimentalizada e de um modelo matemático da difusão do corante fucsina básica neste dispositivo, demonstrou-se as aplicações potenciais como um dispositivo com capacidade de separação e/ou compartimentalização de ambientes diversos tanto para seu uso como *scaffold* nas aplicações de engenharia tecidual como para dispositivo de liberação.

Palavras chaves: celulose bacteriana; scaffold multicompartimentalizado; cultura de célula; engenharia tecidual.

DEVELOPMENT OF BACTERIAL CELLULOSE HYDROGELS FOR CELL CULTURE AND PERMEATION OF BIOMOLECULES

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is secreted by bacteria such as *Gluconacetobacter hansenii* and consist on a network of cellulose nanofibers that provides the main characteristics of biocompatibility and moldability. Despite the excellent characteristics of the biomaterial, one can further alter both their physicochemical properties and their structure form to obtain a differentiated material. The BC structural changes can be made by combining the BC with other compounds *in situ* and morphological changes can be made by the fermentation of BC in different containers with different methods, thereby extending their application area. This work is divided into two parts, the first membranes BC modified were produced and characterized by adding *in situ* glucose or dextrin to the culture medium containing mannitol in static culture (BCG1 and BCDe, respectively). The SEM images showed that there were changes in the network fiber membranes. Both modifications have decreased the specific surface area, the water holding capacity, and the rehydration rate. The results of infrared spectroscopy showed that there was no change in chemical structure of BC. The modification with by addition of glucose on culture medium (BCG1) influenced positively the behavior of fibroblasts, enhancing the adhesion and cell proliferation compared with the control (BCC). In the second part we developed a *multicompartmentalized* BC 3D platform (CM^{3D}). By seeding fibroblasts into the matrix compartment and a mathematical model of the basic fuchsin dye diffusion on this device, it was demonstrated the potential for applications as a device capable of separate and/or compartmentalization of different environments for both their use as scaffold in tissue engineering applications and as release device.

Keywords: *bacterial cellulose; multicompartmentalized scaffold; cell culture; tissue engineering.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ciclo da engenharia tecidual (ET) utilizando-se células autólogas. 1: Um pequeno número de células é removido do corpo. 2: Estas são selecionadas pelo fenótipo e aumentam em número por meio da proliferação *in vitro*. 3: As células são semeadas em um *scaffold*. 4: Os *scaffolds* semeados são colocados em cultura para aumentar ainda mais o número de células. 5: Por fim, o tecido regenerado é implantado no local da lesão para se integrar com o tecido natural. Adaptado de (Barbanti, Zavaglia *et al.*, 2005)..... 31
- Figura 2 - Diferentes arquiteturas de *scaffolds* fornecem células com diferentes evidências topológicas. (A) *Scaffolds* “espuma”. (B) *Scaffolds* micro-fibrosos. (C) *Scaffolds* nanofibrosos. 33
- Figura 3 - Representação das ligações de hidrogênio inter- e intramolecular da celulose. Linhas tracejadas mostram as ligações de hidrogênio intermoleculares, enquanto as linhas pontilhadas mostram as ligações de hidrogênio intramoleculares (Raven, Evert *et al.*, 2010). 36
- Figura 4 - Membranas de celulose bacteriana e suas camadas assimétricas: a), b) e c) diferença de densidade de fibras da camada superior, formada em contato com o ar (mais esbranquiçada), com a inferior, em contato com o meio (mais transparente). Retirado de (Berti, 2012)..... 37
- Figura 5 - Perspectivas para as várias aplicações biomédicas de materiais baseados em celulose bacteriana. Adaptado de (Fu, Zhang *et al.*, 2013). 40
- Figura 6 - Exemplos de aplicações biomédicas da celulose bacteriana como substituto. a) Menisco de porco à esquerda, menisco de CB à direita. b) Curativo para cicatrização da pele. Retirado de (Aung, 2004; Bodin, Concaro *et al.*, 2007). . 41

- Figura 7 - Micrografias do esqueleto de bolacha-do-mar: a) após 24 h de revestimento com celulose bacteriana e b) 72 h de revestimento. Retirado de (Barreiro, Recouvreux *et al.*, 2010)..... 43
- Figura 8 - *Scaffolds* em configuração de tubos de silicone. (A) O *scaffold* é colocado sobre o tubo de silicone menor e fixado com um tubo de silicone maior. O resultado é apresentado na imagem (B e C). Retirado de (Bodin, Bharadwaj *et al.*, 2010). 44
- Figura 9 - Curativo de celulose bacteriana aplicada em uma mão com ferimento. Retirado de (Czaja, Krystynowicz *et al.*, 2006). 46
- Figura 10 - Macro e micro morfologia das esferas de celulose bacteriana. Retirado de (Zhu, Jia *et al.*, 2011)..... 47
- Figura 11 - Fotografias dos *cocoons*: (a) vista lateral, (b) vista superior frontal, (c) *cocoon* seccionado, vista lateral superior, e (d) *cocoon* seccionado, vista frontal superior. Retirado de (Recouvreux, Rambo *et al.*, 2011)..... 48
- Figura 12 - Imagem de tubos de celulose bacteriana com diferentes diâmetros internos (A). Tubo ramificado de CB fermentado em tubo de silicone ramificado (B). Retirado de (Bodin, Backdahl *et al.*, 2007)..... 49
- Figura 13 - Ambiente celular 3D complexo, o qual fornece sinais mecânicos e bioquímicos que guiam as funções das células. Fatores que fornecem sinais importantes para as células, incluindo fatores não-estruturais, tais como a densidade celular, as interações célula-célula e a sinalização de proteínas que são importantes para guiar a diferenciação e função celular. Adaptado de (Owen e Shoichet, 2010)..... 51
- Figura 14 - Micrografias de fibroblastos cultivados sobre um *scaffold* cilíndrico após 5 dias de cultura. (a) Uma camada confluenta de células recobriu todo o *scaffold*. (b) Aumento de escalado *scaffold* mostrando que os fibroblastos aderiram tanto dentro como fora do *scaffold*.

	Barras de escala são: (a) de 150 mm e (b) de 30 mm. Retirado de (Jamal, Bassik <i>et al.</i> , 2010).	54
Figura 15	- a) Imagens das membranas de celulose bacteriana sintetizadas em placas de Petri. Membranas de celulose bacteriana resultantes da adição de dextrina (b) e glicose (c) no meio de cultura. As amostras são representativas de sete lotes de síntese independentes.	65
Figura 16	- Micrografias das membranas liofilizadas de celulose bacteriana: lado superior e inferior com ampliação de 5000×, e visão do corte sagital com ampliação de 10.000×.	67
Figura 17	- Curvas de TGA: CBC (linha sólida), CBGI (linha tracejada) e CBDe (linha pontilhada).	71
Figura 18	- Espectros de FTIR-ATR da celulose bacteriana original (CBC) e da celulose bacteriana produzida por adição de glicose (CBGI) e dextrina (CBDe) ao meio de cultura contendo manitol.	72
Figura 19	- A adesão/proliferação celular quantificada pelo ensaio de MTS como uma função do tempo. Propagação inicial foi de 10^5 células/poço. Barras de erro: desvio padrão entre três poços.	74
Figura 20	- Influência das microestruturas distintas sobre a morfologia dos fibroblastos semeados sobre as membranas de celulose bacteriana, após 24 h. a) CBC, c) CBGI e e) CBDe. Ampliação: 1000×. Imagens de fluorescência das células coradas: b) CBC, d) CBGI e f) CBDe. Ampliação: 100×. Núcleos das células foram corados com DAPI (azul) e o citoesqueleto de actina foi corado com rodamina-faloidina (vermelho).....	75

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Área superficial específica total (ASE), capacidade de retenção de água (CRA) e taxa de reidratação (TR) das construções de CB com meios enriquecidos com glicose (CBGl) e dextrina (CBDe) e seus respectivos desvios padrão. 69
- Tabela 2 - Atribuição das bandas dos espectros de FTIR-ATR de celulose bacteriana original (CBC) e das amostras produzidas pela adição de glicose (CBGl) e dextrina (CBDe) ao meio de cultura. 73

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Principais substitutos cutâneos existentes no mercado mundial e sua classificação segundo critérios de localização, tempo de permanência e origem. Retirado de (Ferreira, Paggiaro *et al.*, 2011). 34
- Quadro 2 - Resumo das modificações da CB realizadas *in situ*. 45

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E CONCEITOS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
a	Altura do pulso
ASE	Área superficial específica
b	Posição do centro do pico
BET	Brunauer-Emmett-Teller (Isoterma de adsorção)
c	Largura da “banda”
CB	Celulose bacteriana
CBC	Membrana de CB controle
CBDe	Membrana de CB modificada pela adição de dextrina no meio de cultura
CBG1	Membrana de CB modificada pela adição de glicose no meio de cultura
CCBTE	Construções de celulose bacteriana para engenharia tecidual
c_i	Concentração da fucsina (i)
CM ^{3D}	Plataforma 3D multicompartimentalizada de CB (BioCellTis/RegenTis)
CMC	Carboximetilcelulose
CRA	Capacidade de retenção de água
D_{i-j}	Coefficientes de difusão da fucsina
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ET	Engenharia tecidual
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR-ATR	Espectroscopia de infravermelho por refletância total atenuada
HAp	Hidroxiapatita
HEK	Células embrionárias de rim humano
MEC	Matriz extracelular circundante
$m_{\text{reidratada}}$	Massa de CB reidratada
m_{seca}	Massa de CB liofilizada
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazólio

$m_{\text{úmida}}$	Massa de CB úmida
v	Estiramento
v_{α}	Estiramento assimétrico
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
SMC	Células musculares lisas e uroteliais
t	Tempo
TGA	Análise termogravimétrica
TR	Taxa de reidratação
USC	Sistema urinário humano
UV	Ultravioleta
δ	Ligação

No contexto do presente trabalho, definimos:

<i>Scaffold</i>	Matriz 2D/3D produzida como suporte para construções de engenharia de tecidos.
Construção	Matriz tridimensional (<i>scaffold</i>) homogênea ou heterogênea, produzida a partir de biopolímero(s) e/ou outros materiais, em geral na forma de hidrogel, própria para ensaios de interesse biológico ou de engenharia tecidual.
Plataforma	Construção básica, em geral obtida a partir de tecnologia proprietária, a partir da qual são derivadas diferentes construções de interesse (Ex.: CM ^{3D} da empresa BioCellTis/RegenTis, www.biocelltis.com).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	22
1.1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA	26
1.2 OBJETIVOS.....	28
1.2.1 Objetivo Geral.....	28
1.2.2 Objetivos Específicos	28
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	29
2.1 ENGENHARIA TECIDUAL	30
2.2 CELULOSE BACTERIANA	35
2.2.1 Propriedades da Celulose Bacteriana	37
2.2.2 Aplicações da Celulose Bacteriana na Área Biomédica. 38	38
2.3 MODIFICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA APLICADAS À ENGENHARIA TECIDUAL.....	41
2.3.1 Modificações <i>in situ</i>	42
2.3.2 Modificações Morfológicas.....	46
2.4 DISPOSITIVOS 2D <i>VERSUS</i> 3D E SUAS APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL	49
2.5 MATRIZES COMPARTIMENTALIZADAS E SUAS APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL.....	55
CAPÍTULO 3 – HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA MODIFICADOS PELO MEIO DE CULTIVO	56
3.1 INTRODUÇÃO.....	58
3.1.1 Modificações <i>In Situ</i>.....	58
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.2.1 Produção de Celulose Bacteriana Modificada.....	61
3.2.2 Caracterização da Celulose Bacteriana Modificada	61

3.2.3 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular	63
3.2.4 Avaliação da Adesão, Densidade e Morfologia Celular .	64
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.3.1. Produção e Caracterização da Celulose Bacteriana Modificada	64
3.3.2 Avaliação da Adesão e Proliferação Celular.....	73
3.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS	76
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES	
PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	81
REFERÊNCIAS	82

ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO

Esta dissertação descreve a produção de novas plataformas de celulose bacteriana, com a adição de compostos selecionados ao meio de cultura, bem como o uso de uma plataforma multicompartimentalizada, ambas propícias ao cultivo de células animais, visando aplicações para a engenharia tecidual. A dissertação está organizada em capítulos da seguinte forma:

- Capítulo 1 – Introdução sobre quais foram os fatores que motivaram a execução deste trabalho e suas justificativas, assim como o objetivo principal com as suas vertentes que levaram à execução de cada uma das etapas aqui apresentadas.
- Capítulo 2 – Fundamentação teórica sobre os temas aqui envolvidos, tais como as modificações realizadas na celulose bacteriana e as plataformas já relatadas na literatura. Este capítulo tem como objetivo destacar a importância do desenvolvimento de novas plataformas para auxiliar desenvolvimentos futuros em engenharia tecidual.
- Capítulo 3 – Hidrogel de celulose bacteriana modificado pelo meio de cultivo. Descreve a importância de melhorar as propriedades da celulose bacteriana e expandir a sua utilização como substrato para as aplicações de engenharia tecidual. Neste capítulo por meio da adição de glicose e dextrina no meio de cultura contendo manitol obtiveram-se membranas com morfologias de fibras diferenciadas. As membranas foram caracterizadas, a adesão e a proliferação de fibroblastos foram avaliadas em função do tempo de cultivo em cada membrana.
- Capítulo 4 – Construção de celulose bacteriana 3D compartimentalizada. Apresenta a produção e a caracterização dessa plataforma de celulose e sua potencial aplicação como dispositivo de liberação e como *scaffold* na engenharia tecidual. Para isso, um modelo matemático capaz de descrever o transporte intercompartimental foi desenvolvido e aplicado na análise da difusão do corante fucsina básica a partir da plataforma. Além disso, fibroblastos foram semeados nestes dispositivos e a viabilidade celular foi avaliada.
- Capítulo 5 – Considerações finais da dissertação e as sugestões para continuidade destes estudos.

**CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO,
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

1.1 INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Biomateriais, bioengenharia, engenharia biomédica, biotecnologia, biomecânica, liberação de fármacos, medicina regenerativa e engenharia tecidual são áreas e especialidades do conhecimento relativamente novas, cuja definição nem sempre é clara, sendo praticamente impossível evitar a superposição entre essas áreas e temas. Embora os princípios da engenharia tecidual ou engenharia de tecidos (ET) sejam hoje fundamentais para o exercício e desenvolvimento da medicina regenerativa, oferecendo o potencial de prover novos tratamentos nas áreas da pele, cartilagem, osso, doenças cardiovasculares e doenças do sistema nervoso central, apenas produtos para pele e cartilagem foram comercializados até agora.

A ET é uma área multidisciplinar em emergência onde se aplicam os princípios das engenharias e das ciências da vida (química, física, biologia, etc.), visando o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido. Além da produção de tecidos artificiais, do aprimoramento de técnicas de cultivo e análise de células nas estruturas tridimensionais complexas que formam os tecidos, a ET necessita do desenvolvimento de novos materiais com alta biocompatibilidade e melhoria das suas características físico-químicas. O estudo das interações entre células e suportes (*scaffolds*) biopoliméricos na ET é de grande importância para a determinação das propriedades biológicas dos implantes.

Biomateriais são materiais, sintéticos ou naturais, utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos. Estes biomateriais são novos materiais projetados para substituir partes do corpo e permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por doenças ou acidentes. Para isso, um biomaterial considerado ideal deve possuir características únicas, tais como ser biocompatível, biofuncional, poroso, possuir superfície apropriada para adesão celular, promover a produção da matriz extracelular circundante (MEC) entre outras.

Os biomateriais utilizados em dispositivos médicos de ET, em particular os que visam à produção de *scaffolds* implantáveis, dispositivos diagnósticos e biossensores, constituem-se em geral de materiais relativamente isotrópicos, de estrutura definida e homogênea do ponto de vista espacial. Assim, biopolímeros são normalmente tratados como *scaffolds* uniformes, não compartimentalizados, onde a ancoragem de entidades biologicamente ativas (moléculas e células) em geral ocorre na superfície do material ou estão mais ou menos bem distribuídas em seu interior. A investigação sistemática e a manipulação

das propriedades físico-químicas de biopolímeros, sua interação com diferentes linhagens celulares e a criação de estruturas macroscópicas produzidas de forma programada, para uso como dispositivos de liberação de fármacos ou como *scaffolds* para ET podem gerar novas e abrangentes linhas de pesquisa na biomedicina. Assim, os avanços recentes na área de biomateriais e suas aplicações em áreas biomédicas mostram o grande potencial de vários polissacarídeos no desenvolvimento de novas classes de materiais médicos. A celulose bacteriana (CB) pertence a uma das classes promissoras de biopolímeros. É um polissacarídeo excretado extracelularmente por diversas bactérias, entre elas a *Gluconacetobacter hansenii*, anteriormente conhecida como *Acetobacter xylinum*.

A CB possui propriedades físicas e mecânicas não apresentadas por outros biomateriais, entre elas pode-se destacar sua morfologia, pureza, hidrofiliabilidade e biocompatibilidade. Entretanto, seu potencial para transformação em produto de alto valor biotecnológico ainda não foi completamente explorado. Essas propriedades físico-químicas, abrangendo variações no tamanho dos poros, área superficial, capacidade de retenção de água e taxa de reidratação, bem como a micro e a macroestrutura da CB podem ser afetadas por modificações conduzidas pela composição do meio de cultura (*in situ*). Há vários trabalhos na literatura sobre essas modificações, porém são poucas as pesquisas com enfoque em aplicações biomédicas dessas novas formulações. Além disso, podem-se realizar modificações morfológicas da CB criando-se assim novos dispositivos, essas modificações podem ser realizadas pela fermentação da CB em diferentes recipientes por meio da utilização de diferentes metodologias, estendendo assim sua área de aplicação.

As modificações químicas de superfície, a incorporação de moléculas bioativas, modificações da porosidade e cristalinidade, *design* de estruturas tridimensionais e nanocompósitos são exemplos de métodos viáveis para tornar a CB um material ideal para aplicações biomédicas. A CB modificada poderia funcionar como um material em forma de *scaffold* para a regeneração de uma grande variedade de tecidos se tiver características comprovadamente melhoradas em relação à CB nativa, o que pode eventualmente fazer deste material uma plataforma tecnológica excelente para a medicina. Se essa CB modificada puder ser produzida, com o auxílio da engenharia química, em grande escala com sucesso, ela acabará por se tornar um biomaterial interessante para a criação de uma ampla variedade de dispositivos médicos e produtos de consumo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Produzir e/ou desenvolver novas plataformas de celulose bacteriana com a adição de compostos *in situ*, bem como realizar ensaios com uma plataforma multicompartimentalizada, ambas propícias ao cultivo de células animais, visando aplicações para a engenharia tecidual.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Modificar e caracterizar membranas de CB com adição de compostos *in situ* (dextrina e glicose);
- Produzir e caracterizar uma plataforma 3D multicompartimentalizada de CB;
- Avaliar a viabilidade e proliferação de células de fibroblastos nas plataformas produzidas;
- Analisar experimentalmente a difusão *in vitro* do corante fucsina nos compartimentos da CM^{3D};
- Modelar a liberação da fucsina no dispositivo.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENGENHARIA TECIDUAL

Palsson e Bathia (2004) adotam a definição genérica de engenharia tecidual ou engenharia de tecidos (ET) como a “aplicação dos princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos para restaurar, manter ou melhorar a função tecidual” (Palsson e Bhatia, 2004). A ET é um campo interdisciplinar onde se aplicam os princípios da engenharia e das ciências da vida, visando o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou melhoram a função do tecido (Langer, 2000).

Os órgãos do corpo humano são sistemas biológicos altamente sofisticados. Cada um mantém seu próprio conjunto de condições biológicas necessárias para sustentar as funções específicas do tecido e permitir o seu reparo. Muitos tipos diferentes de *scaffolds* têm sido utilizados para alcançar objetivos diferentes. Os *scaffolds* são modificados para fazer a interface com as células do tecido de cicatrização e podem incluir biopolímeros que transmitem os sinais corretos para as células de reconstrução do tecido. Deste modo, existe uma grande capacidade de adaptação de arquitetura e atividade biológica do *scaffold* para as necessidades de um tipo particular de tecido (Stock e Vacanti, 2001).

Estes *scaffolds* são difíceis de serem imitados fora do corpo. Uma abordagem consiste em utilizar o corpo como incubadora (Service, 2005), diretamente sobre o desenho dos tecidos naturais, para permitir a geração de novos tecidos. Outra abordagem é a utilização de *scaffolds* que proporcionam uma representação adequada e aprimorada do ambiente do tecido, estimulando as células à gerar novos tecidos (**Figura 1**).

Os *scaffolds* para ET são projetados para prover uma estrutura de suporte ao tecido e seu *design* pode ser dividido de duas formas: não porosos ou densos, de maneira a proteger as células implantadas do sistema imunológico, ou porosos, de forma a permitir a incorporação de novas células no corpo (Williams, 1999). Por exemplo, um *scaffold* considerado ideal para ser utilizado como substituto cutâneo deve possuir propriedades comparáveis às da pele humana como: suportar hipóxia, ampla disponibilidade, presença de componentes dérmicos e epidérmicos, reologia comparável à da pele, resistência à infecção, custo/benefício adequado, facilidade de preparação, baixa antigenicidade, facilidade de armazenamento e resistência ao cisalhamento (Ferreira, Paggiaro *et al.*, 2011).

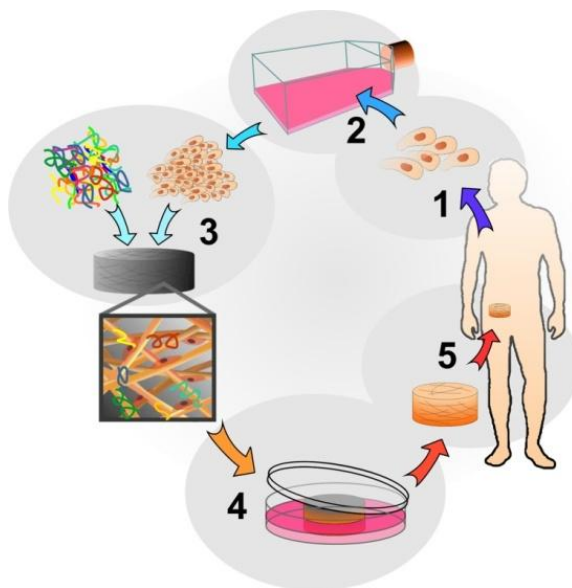


Figura 1 - Ciclo da engenharia tecidual (ET) utilizando-se células autólogas. 1: Um pequeno número de células é removido do corpo. 2: Estas são selecionadas pelo fenótipo e aumentam em número por meio da proliferação *in vitro*. 3: As células são semeadas em um *scaffold*. 4: Os *scaffolds* semeados são colocados em cultura para aumentar ainda mais o número de células. 5: Por fim, o tecido regenerado é implantado no local da lesão para se integrar com o tecido natural. Adaptado de (Barbanti, Zavaglia *et al.*, 2005).

O estudo das interações entre as células e os *scaffolds* biopoliméricos na ET é de grande importância para a determinação das propriedades biológicas dos implantes. A diversidade de respostas celulares a diferentes materiais evidencia a capacidade das células de discriminar quimicamente o *scaffold*, de se adaptar a ele e de aderir ou não à sua superfície (Anselme, 2000). Este evento é importante, pois a adesão das células ao *scaffold* poderá influenciar eventos celulares posteriores como a proliferação, viabilidade e migração celular.

Uma das definições correntes diz que “biomateriais são materiais (sintéticos ou naturais; sólidos ou, às vezes, líquidos) utilizados em dispositivos médicos ou em contato com sistemas biológicos” (Ratner, 2004), enquanto que na definição clássica biomaterial é “parte de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (Helmus e Hubbell, 1993).

Estes biomateriais são novos materiais projetados para substituir partes do corpo e permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por doenças ou acidentes. Para isso, um biomaterial considerado ideal, no sentido regenerativo da palavra, deve possuir as seguintes características: ser biocompatível, biofuncional, bioabsorvível, poroso, permeável para passagem de nutrientes e troca de gases, possuir um tamanho de poros que permita a penetração celular e formação de tecido, possuir superfície apropriada para adesão celular, promover a produção da matriz extracelular circundante (MEC) e transportar e transmitir sinais biomoleculares (Yang, Leong *et al.*, 2001; Palsson e Bhatia, 2004).

Aproveitar a capacidade regenerativa das células exige uma compreensão complexa dos sinais que estimulam as diferentes respostas celulares que levam à regeneração do tecido. Diferentes tipos de *scaffolds* fornecem às células sinais diferentes. Estas evidências são apresentadas tanto pela topologia em macroescala do *scaffold* (**Figura 2**), bem como pelas características da superfície em nanoescala e química de superfície (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Lund, Yener *et al.*, 2009). Diferentes arquiteturas de *scaffolds* fornecem células com diferentes evidências topológicas. *Scaffolds* “espuma” com grandes poros interligados, permite o crescimento das células com uma grande e contínua área de superfície para a fixação. *Scaffolds* micro-fibrosos podem ser sintetizados para terem uma maior porosidade. Onde há uma grande diferença entre as fibras, estas fibras servem como guias de adesão e alongamento celular, porém isto pode restringir o contato das células com as diferentes fibras. *Scaffolds* nanofibrosos têm uma maior área de superfície em relação à massa e podem ser fabricados com uma elevada porosidade. O tamanho do foco de adesão é limitado pelo diâmetro da fibra, reduzindo a capacidade de uma célula desenvolver um citoesqueleto forte de tal maneira que as células podem permanecer mais arredondadas e estacionárias dentro do *scaffold* (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Lund, Yener *et al.*, 2009).

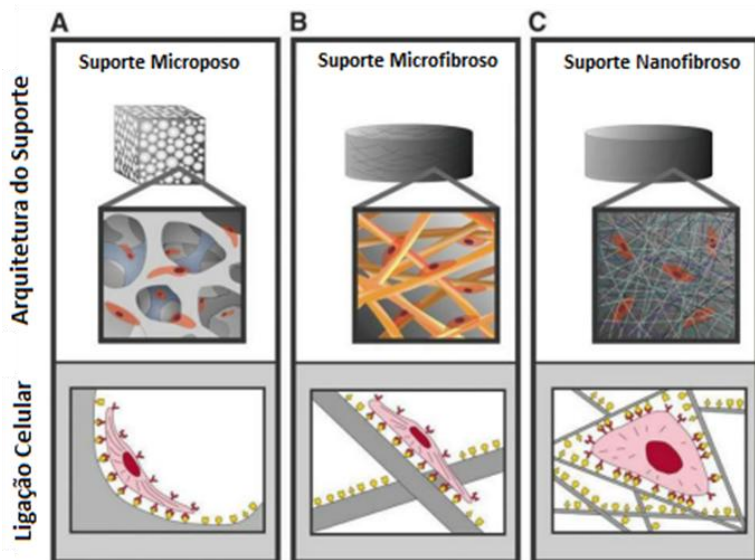


Figura 2 - Diferentes arquiteturas de *scaffolds* fornecem células com diferentes evidências topológicas. (A) *Scaffolds* “espuma”. (B) *Scaffolds* micro-fibrrosos. (C) *Scaffolds* nanofibrrosos.

As células podem responder a estímulos de muitas maneiras diferentes e basear a sua resposta por meio de muitos fatores, os quais podem incluir seu atual estado de diferenciação, a disponibilidade de metabólitos, a presença de fatores de crescimento e a ligação direta com sequências específicas de peptídeos encontrados em proteínas da matriz extracelular circundante (MEC) (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Lund, Yener *et al.*, 2009). O ambiente da MEC pode ser replicado, controlado e manipulado pela fabricação de *scaffolds* engenheirados que proporcionam ambientes artificiais para o crescimento celular (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Lund, Yener *et al.*, 2009).

Os substitutos cutâneos são de grande importância para a cirurgia plástica, sendo principalmente utilizados no tratamento de queimaduras e outros ferimentos graves (Shores, Gabriel *et al.*, 2007). Com o aumento da utilização dos *scaffolds* surgiu a necessidade e a preocupação com a qualidade dos materiais que são vendidos; assim, existe no mercado mundial uma diversidade de *scaffolds* utilizados como substitutos cutâneos, os quais devem ser escolhidos cuidadosamente observando a situação clínica do paciente. No **Quadro 1** é apresentado um painel geral dos substitutos cutâneos mais conhecidos e suas respectivas características.

Quadro 1 - Principais substitutos cutâneos existentes no mercado mundial e sua classificação segundo critérios de localização, tempo de permanência e origem. Retirado de (Ferreira, Paggiaro *et al.*, 2011).

Produto	Classificação	Composição
Pele de cadáver (produto não comercial)	C P b	Pele humana, alógena, descelularizada, conservada em glicerol.
Integra [®]	C P bs	Acelular e bilaminar: matriz de colágeno bovino e condroitina-6-sulfato (análogo dérmico), recoberta por fina lâmina de silicone.
Biobrane [®]	C P bs	Bilaminar: rede de náilon preenchido com colágeno porcino tipo I e coberto por fina lâmina de silicone.
Apligraf [®]	C P bs	Bilaminar: gel de colágeno I bovino povoado com fibroblastos neonatais vivos e coberto por camada de células epiteliais (queratinócitos neonatais).
Orcel [®]	C P b	Queratinócitos e fibroblastos humanos cultivados separadamente em colágeno bovino tipo I.
Alloderm [®]	D P b	Matriz dérmica acelular derivada de pele humana de cadáver.
Âmnio conservado em glicerol (produto não comercial)	D P b	Matriz colágena de substituição dérmica.
Dermagraft [®]	D P b	Fabricado a partir de fibroblastos humanos derivados do prepúcio de recém-nascidos.
OASIS [®]	D T b	Matriz de regeneração dérmica derivada da submucosa do jejuno de suínos.
Permacol [®]	D T b	Derivado de colágeno de derme e elastina porcina.
Matriderm [®]	D P b	Matriz tridimensional de colágeno e elastina.
Epidex [®]	E P b	Gerado por cultura de queratinócitos autólogos retirados do folículo piloso do couro cabeludo.

Cultura de queratinócitos humanos autógenos (produto não comercial)	E P b	Queratinócitos humanos autógenos cultivados e transportados em rede de fibrina.
---	-------	---

2.2 CELULOSE BACTERIANA

Diversos biopolímeros têm sido investigados como *scaffolds*, dentre os quais se destaca a celulose bacteriana, CB (Svensson, Nicklasson *et al.*, 2005). A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n, é um homopolissacarídeo neutro, formado por cadeias lineares não ramificadas de monossacarídeos de β-D-glicose, unidos por ligação β(1→4). Essas ligações dão um alinhamento linear para a molécula, o que permite a formação de duas ligações hidrogênio intramoleculares dentro de cada resíduo de glicose: uma ligação liga o O(6) com o O(2)H do resíduo seguinte e a outra liga o O(3)H com o O(5). A ligação intermolecular de hidrogênio liga as diferentes cadeias de celulose, a partir de O(3) para O(6)H (**Figura 3**). A unidade estrutural de repetição é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose. A cadeia glicana pode ter de 2000 a mais de 5000 resíduos de glicose. A hidrólise total da celulose produz moléculas de glicose, enquanto que a hidrólise parcial produz moléculas de celobiose (Brown, Saxena *et al.*, 1996; Raven, Evert *et al.*, 2010).

A celulose é um biopolímero presente na natureza, como componente estrutural das paredes celulares de plantas e algas e é o composto orgânico mais abundante na Terra, não existindo como uma única cadeia (Raven, Evert *et al.*, 2010). As moléculas longas e rígidas de celulose combinam-se para formar as microfibrilas, cada uma consistindo de várias cadeias de celulose. As cadeias de celulose que compõem a microfibrila estão orientadas paralelamente, formando ligações de hidrogênio intramolecular (Raven, Evert *et al.*, 2010).

A CB, diferentemente da celulose das plantas, não contém lignina e hemicelulose e também não contém componentes de origem animal e nenhuma espécie de proteína; portanto, não causa reações alérgicas (Sanchavanakit, Sangrungrangroj *et al.*, 2006). A CB é um polissacarídeo extracelular, excretado por diversas bactérias (*Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ou *Sarcina* (El-Saied, Basta *et al.*, 2004)), entre elas a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, anteriormente conhecida como *Acetobacter xylinum*. Esta bactéria não é patogênica, é uma bactéria Gram-negativa em forma de

bastonete, aeróbica, capaz de excretar celulose extracelularmente em longas nanofibras não agregadas (Brown, Willison *et al.*, 1976; Iguchi, Yamanaka *et al.*, 2000; Brown, 2004; Klemm, Schumann *et al.*, 2006; Bodin, Backdahl *et al.*, 2007; Backdahl, Esguerra *et al.*, 2008; Mckenna, Mikkelsen *et al.*, 2009).

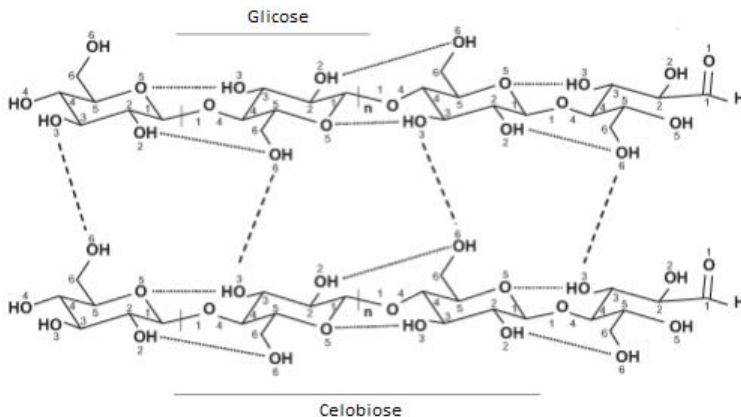
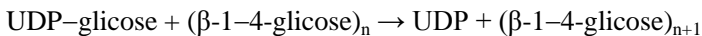


Figura 3 - Representação das ligações de hidrogênio inter- e intramolecular da celulose. Linhas tracejadas mostram as ligações de hidrogênio intermoleculares, enquanto as linhas pontilhadas mostram as ligações de hidrogênio intramoleculares (Raven, Evert *et al.*, 2010).

A *G. hansenii* é capaz de converter várias fontes de carbono em celulose, mas o seu mecanismo de síntese ainda não é claro; presume-se, no entanto, que seja semelhante ao da *Gluconacetobacter xylinus*, que começa sempre com o precursor de UDP-glicose e termina formando uma cadeia polissacarídica (Bodin, Backdahl *et al.*, 2007). O mecanismo que resulta na produção de um fibra de CB para a *G. xylinus* é mostrado abaixo:



Fora da superfície celular das bactérias, as forças de van der Waals dispõem as cadeias de celulose para formar fibras subelementares, as quais são então ligadas entre si por ligações de hidrogênio para formar as microfibrilas. Finalmente, as microfibrilas são montadas em conjunto em uma fita (ou microfibra).

Na natureza, a bactéria forma biofilmes de celulose em frutas e superfícies de flores. Há algumas hipóteses sobre os motivos pelos quais a bactéria produz a celulose: a película serviria como um meio de

proteção contra a luz UV e contra inimigos naturais (Iguchi, Yamanaka *et al.*, 2000); também poderia ser usada para reter umidade ou como um dispositivo flutuante, que permite o contato da bactéria com a atmosfera (Schramm e Hestrin, 1954; Iguchi, Yamanaka *et al.*, 2000).

A CB pode ser moldada em estruturas 3D *in vitro* durante a cultura. Variações estruturais, tais como a espessura e a densidade da rede podem ser controladas por alterações das condições de cultura. A CB é produzida em uma estrutura em camadas e assimétrica na interface do ar e líquido, resultando em uma superfície densa voltada para o ar e uma formação de rede mais gelatinosa em contato com o líquido (**Figura 4**) (Klemm, Schumann *et al.*, 2001; Backdahl, Helenius *et al.*, 2006; Recouvreux, 2008; Berti, 2012).

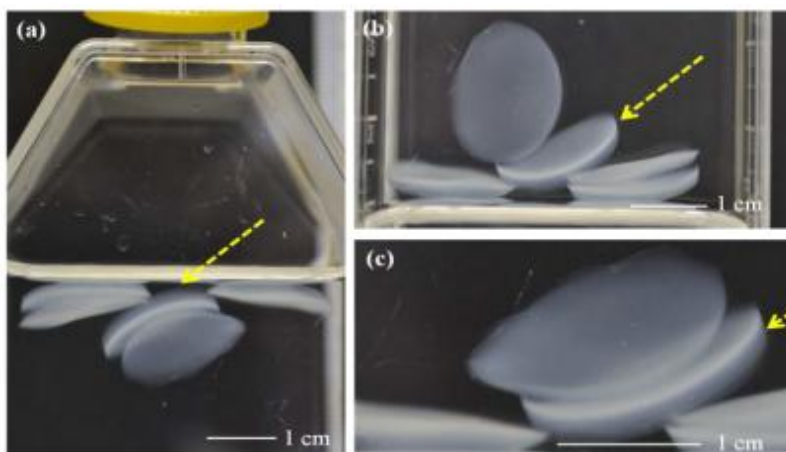


Figura 4 - Membranas de celulose bacteriana e suas camadas assimétricas: a), b) e c) diferença de densidade de fibras da camada superior, formada em contato com o ar (mais esbranquiçada), com a inferior, em contato com o meio (mais transparente). Retirado de (Berti, 2012).

2.2.1 Propriedades da Celulose Bacteriana

A CB difere da celulose vegetal em relação ao seu tamanho, cristalinidade e pureza (Krystynowicz, Czaja *et al.*, 2002; Svensson, Nicklasson *et al.*, 2005; Wan, Hutter *et al.*, 2006; Barud, Barrios *et al.*, 2008). Devido a estas propriedades físico-químicas, o interesse em novos campos de aplicação e o desenvolvimento de novos métodos para a sua produção em massa vem aumentando. A *Gluconacetobacter hansenii* produz rapidamente agregados de microfibrilas de diferentes

formas dependendo dos métodos de cultivo e grau de agitação e aeração (Lee, Deng *et al.*, 2001; Ciechanska, 2004; Recouvreux, 2008; Recouvreux, Rambo *et al.*, 2011).

Entre algumas das propriedades da CB podem ser destacadas sua morfologia, caracterizada por uma estrutura de rede fibrosa ultrafina tridimensional que indica a existência de micro-canais de tamanho variável (Sokolnicki, Fisher *et al.*, 2006; Marzieh Moosavi-Nasab, 2010). A CB é altamente hidrofílica, absorvendo mais de 100 vezes sua massa em água (Choi, Song *et al.*, 2009; Lin, Hsu *et al.*, 2009) e possui cristalinidade de 84-89% (Czaja, Romanovicz *et al.*, 2004; Li, Kim *et al.*, 2011), que pode ser influenciada pelo arranjo molecular cristalográfico (Klemm, Heublein *et al.*, 2005; Bodin, Ahrenstedt *et al.*, 2007). Além disso, possui módulo de elasticidade relatado de 78 GPa (Iguchi, Yamanaka *et al.*, 2000; Guhados, Wan *et al.*, 2005), alto grau de polimerização (até 8000) (Wan, Hutter *et al.*, 2006), uma fina rede em formato de teia (Barud, Barrios *et al.*, 2008), alta permeabilidade caracterizada pela alta porosidade (aprox. 94,1%) (Meftahi, Khajavi *et al.*, 2010) e devido à cristalinidade e ao pequeno diâmetro das fibras, a CB possui excelente resistência mecânica e elevada área superficial (Sokolnicki, Fisher *et al.*, 2006), além de ser moldável.

Essas propriedades mecânicas, bem como a micro e a macroestrutura da CB são influenciadas pelo ambiente do meio de cultura e do tratamento após a síntese. Além disso, a porosidade das membranas de CB pode ser devidamente adaptada, variando as condições fisiológicas de crescimento bacteriano, tais como composição do meio de cultura, o seu pH, temperatura, tensão de oxigênio, bem como por modificações químicas (Ramana, Tomar *et al.*, 2000). A bactéria *G. hansenii* possui a capacidade de sintetizar celulose a partir de uma variedade de substratos (glicose, sacarose, frutose, glicerol, manitol, entre outros), possibilitando dessa forma modificar e controlar as propriedades físicas e químicas da celulose durante a sua síntese (Lee, Deng *et al.*, 2001; Ciechanska, 2004).

2.2.2 Aplicações da Celulose Bacteriana na Área Biomédica

A aplicabilidade da CB se estende a diversas áreas. Os polímeros à base de celulose têm amplas aplicações em engenharia tecidual, como em sistemas de liberação “controlável” de fármacos, de purificação do sangue, como sensor, na agricultura, bem como na purificação de água (Chang e Zhang, 2011). Além disso, a sua biocompatibilidade, hidrofílicidade, transparência e não-toxicidade a torna um candidato atraente para uma ampla gama de aplicações em

diversas áreas, especialmente aquelas relacionadas com aplicações biomédicas e de biotecnologia (Dahman, 2009). Na indústria de cosméticos a CB é utilizada em hidratantes e adstringentes; em empresas de aparelhos eletroacústicos ela é utilizada como membrana para aparelhos de áudio de alta qualidade (Nishi, Uryu *et al.*, 1990); é utilizada como papel eletrônico (Shah e Brown, 2005); como membranas de células a combustível (Evans, O'Neill *et al.*, 2003) e também na indústria alimentícia é utilizada na produção de doces, sorvetes de baixas calorias, aperitivos, espessantes e soro para redução do colesterol (Phisalaphong, Suwanmajo *et al.*, 2008).

Nos últimos anos a aplicação da CB como material na área biomédica tem atraído muita atenção, devido às suas propriedades e sua biocompatibilidade, a qual vem sendo avaliada *in vivo*. Recentemente, alguns pesquisadores estudaram a utilização da CB em cirurgias de restituição da laringe (De Souza, Olival-Costa *et al.*, 2011). Esses estudos de biocompatibilidade da CB *in vivo* que utilizam modelos animais têm demonstrado uma excelente integração da CB com o tecido lesado sem a presença de processos inflamatórios agudos. Helenius e colaboradores (2006) mostraram que a CB é um material que se integra totalmente ao tecido hospedeiro *in vivo* e não induz processos inflamatórios e nem rejeição ao longo do tempo (Helenius, Backdahl *et al.*, 2006). Na **Figura 5** é mostrado as perspectivas para as várias aplicações biomédicas de materiais de CB.

Devido à sua estrutura única de rede tridimensional em nanoescala, a CB possui uma capacidade de retenção de água elevada, uma elevada resistência mecânica, excelente biocompatibilidade, propriedades que lhe permitem servir como um material polimérico natural para a regeneração de uma grande variedade de tecidos (Czaja, Krystynowicz *et al.*, 2006; Klemm, Schumann *et al.*, 2006; Macneil, 2007; Siro e Plackett, 2010). Porém, a CB não é apenas um material interessante para soluções de cura da pele, mas estudos recentes têm proposto a CB como biomaterial para os vasos sanguíneos artificiais e substituição de menisco (Klemm, Schumann *et al.*, 2001; Backdahl, Helenius *et al.*, 2006; Bodin, Concaro *et al.*, 2007; Oliveira, 2011). Além disso, a CB despertou maior interesse nos últimos anos devido à capacidade de utilizá-la tanto como um material compósito como um substrato de ET (Hsieh, Yano *et al.*, 2008).



Figura 5 - Perspectivas para as várias aplicações biomédicas de materiais baseados em celulose bacteriana. Adaptado de (Fu, Zhang *et al.*, 2013).

Entre as aplicações biomédicas da CB, podem ser incluídas: substituto temporário da pele para recuperação de ferimentos e queimaduras (Ciechanska, 2004; Czaja, Krystynowicz *et al.*, 2006; Czaja, Young *et al.*, 2007); sistema para liberação de fármacos; produção de vasos sanguíneos; recuperação de nervos; recuperação da gengiva; recuperação da dura-máter; revestimento de *stents*; válvula cardíaca; uretra; prótese artificial; cartilagem artificial; e material de regeneração óssea (Klemm, Schumann *et al.*, 2001; Svensson, Nicklasson *et al.*, 2005; Klemm, Schumann *et al.*, 2006; Wan, Hutter *et al.*, 2006; Czaja, Young *et al.*, 2007; Shezad, Khan *et al.*, 2009; Wang, Gao *et al.*, 2010; Oshima, Taguchi *et al.*, 2011; Petersen e Gatenholm, 2011). Na **Figura 6** é mostrado uma das aplicações da CB na área biomédica.

Embora a CB tenha um grande potencial para se tornar um biomaterial importante no futuro, no momento a sua comercialização é limitada: por exemplo, as empresas "Celulose Soluções" e "Xylos Corporation" têm produtos de CB para curativo no mercado, com as marcas DermafillTM e XCell[®], respectivamente. Algumas das razões pelas quais o mercado de CB não cresceu ainda são a necessidade de uma otimização do processo de fermentação e de uma análise completa das propriedades físico-mecânicas do material (Vandamme, De Baets *et al.*, 1998; Bodin, Concaro *et al.*, 2007).

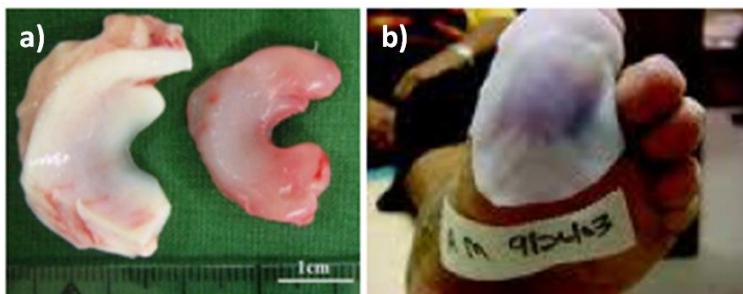


Figura 6 - Exemplos de aplicações biomédicas da celulose bacteriana como substituto. a) Menisco de porco à esquerda, menisco de CB à direita. b) Curativo para cicatrização da pele. Retirado de (Aung, 2004; Bodin, Concaro *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços recentes e da existência de alguns produtos de CB no mercado, ainda são necessárias mais pesquisas interdisciplinares para fazer da CB um produto de sucesso comercial. É necessário uma melhor caracterização dos novos produtos à base de CB, e testes *in vitro* devem ser realizados com uma maior variedade de células animais para verificar sua viabilidade e proliferação e também há necessidade de um grande número de estudos clínicos para provar sua utilidade e funcionalidade (Czaja, Young *et al.*, 2007).

2.3 MODIFICAÇÕES DA CELULOSE BACTERIANA APLICADAS À ENGENHARIA TECIDUAL

A CB se destaca como candidata promissora para a produção de novas formulações que podem ser utilizados em uma grande variedade de aplicações. Particularmente, as aplicações na área biomédica têm ganhado destaque por causa do crescente interesse tanto na área de cuidados com ferimentos como na regeneração de tecidos. A CB pode ser modificada para melhorar ainda mais suas propriedades visando, dependendo da aplicação biomédica prevista, uma maior integração da celulose com o tecido hospedeiro (biocompatibilidade), uma maior degradação *in vivo*, ou modificações das propriedades mecânicas.

As propriedades mecânicas, bem como a micro e a macroestrutura da CB podem ser afetadas por modificações estruturais conduzidas pela composição do meio de cultura (*in situ*) e/ou pelo tratamento após a síntese (*ex situ*). Também, pode-se realizar a fermentação da CB em diferentes recipientes com diferentes formatos e aplicando distintas metodologias para obter as aqui chamadas

modificações morfológicas. Nesta revisão serão abordados os dois tipos de modificações que serão realizadas nesse trabalho, a modificação *in situ* e a morfológica.

2.3.1 Modificações *in situ*

Há vários trabalhos na literatura sobre as modificações da CB *in situ* (Hu e Catchmark, 2010; Huang, Chen *et al.*, 2010; Saibuatong e Phisalaphong, 2010; Huang, Chen *et al.*, 2011; Perotti, Barud *et al.*, 2011; Ul-Islam, Khan *et al.*, 2012) e *ex situ* (Buyanov, Gofman *et al.*, 2010; Gea, Bilotti *et al.*, 2010; Trovatti, Oliveira *et al.*, 2010; Woehl, Canestraro *et al.*, 2010; Barud, Souza *et al.*, 2011; Cai e Yang, 2011; George, Ramana *et al.*, 2011; Muller, Rambo *et al.*, 2011; Oshima, Taguchi *et al.*, 2011; Sakaguchi, Ohura *et al.*, 2011; Barud, Caiut *et al.*, 2012; Chang, Chen *et al.*, 2012; Feng, Zhang *et al.*, 2012; Ul-Islam, Khan *et al.*, 2012), porém são poucas as pesquisas com enfoque em aplicações biomédicas desses novos compósitos.

Em relação aos trabalhos publicados nos últimos quatro anos, percebe-se uma grande necessidade de mais estudos sobre modificações *in situ* da CB, pois há poucos trabalhos relatados; em relação às modificações *ex situ* da CB há um maior número de publicações. Contudo, ainda há certa escassez de estudos mais aprofundados sobre sua aplicabilidade biomédica.

Estudos recentes realizados em nosso grupo e outros apresentados na literatura, têm demonstrado modificações estruturais realizadas com o acréscimo de diferentes compostos no meio de cultura (*in situ*) na produção da CB. Com o intuito de melhorar a produção, as características físico-químicas e a biocompatibilidade deste biomaterial, porém a maioria dos trabalhos publicados visa à mudança apenas da porosidade do biomaterial. Barreiro e colaboradores (2010) desenvolveram um método para modificar a porosidade da CB. Os autores utilizaram o esqueleto da bolacha-do-mar (*Clypeaster subdepressus*) que é composto de $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ e apresenta uma estrutura de poros interligados como molde para a produção de CB, sendo primeiro revestido por CB produzida por *Gluconacetobacter hansenii* e posteriormente revestido com fosfato de cálcio (apatita) (**Figura 7**). Após o revestimento, os poros de pequeno porte foram parcialmente cobertos por microfibrilas de celulose, onde as partículas de apatita foram depositadas de forma homogênea. A espessura e a massa da camada de CB aumentaram com o tempo de cultura. Os autores sugerem que a geometria dos poros da bolacha-do-mar é

adequada para a regeneração óssea, permite a migração celular através de seus grandes poros e permite a vascularização através dos poros de pequeno porte. Ainda, o revestimento CB/apatita oferece uma superfície bioativa para adesão celular e pode ser útil na regeneração do tecido ósseo (Barreiro, Recouvreur *et al.*, 2010).

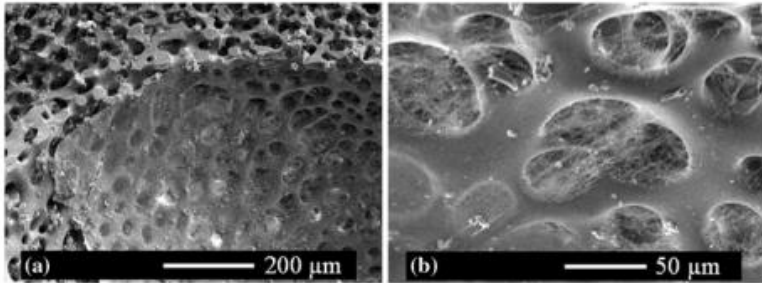


Figura 7 - Micrografias do esqueleto de bolacha-do-mar: a) após 24 h de revestimento com celulose bacteriana e b) 72 h de revestimento. Retirado de (Barreiro, Recouvreur *et al.*, 2010).

Grande e colaboradores (2009) também desenvolveram um método para produzir uma CB altamente porosa. Os autores acrescentaram nanopartículas de hidroxiapatita (HAp) que permaneceram suspensas no meio de cultura durante a fermentação das nanofibras de celulose pela bactéria *Gluconacetobacter saccharivorans* e então carboximetilcelulose (CMC) foi adicionada no meio a fim de evitar a sedimentação das nanopartículas e controlar a viscosidade do meio. Ao utilizar CMC, o diâmetro médio das fibras de CB foi quase 50 % mais baixo do que o diâmetro médio das fibras de CB não modificada. Além disso, o tamanho do poro da CB aumentou 47,8 % quando a CMC foi adicionada ao meio de cultura. A cristalinidade da CB pura demonstrou ser menor do que a do compósito e, assim, as ligações químicas entre os componentes proporcionaram uma estabilização química do nanocompósito. Além disso, a biocompatibilidade e a viabilidade de células nos nanocompósitos obtidos foram confirmadas pela cultura de células embrionárias de rim humano (HEK), fatores que fazem deste nanocompósito um material com potencial para aplicações biomédicas (Grande, Torres *et al.*, 2009). Neste mesmo contexto, Saska e colaboradores (2011) desenvolveram e avaliaram as propriedades biológicas das membranas de CB-hidroxiapatita (CB-HAp) para regeneração óssea. Membranas CB-HAp foram avaliadas em defeitos ósseos não críticos em tíbias de ratos, os testes *in vivo* não mostraram reação inflamatória e, após quatro semanas,

os defeitos ósseos foram completamente preenchidos pelo novo tecido ósseo; assim, as membranas CB-HAp foram eficientes para a regeneração óssea (Saska, Barud *et al.*, 2011).

Para aplicações na área de engenharia de tecidos ósseos uma estrutura de poros microscópicos é necessária para facilitar o ingresso de osteoblastos e formação de um tecido mineralizado. Com essa finalidade, Zaborowska e colaboradores prepararam em 2010, utilizando um biorreator, *scaffolds* incorporando microesferas de parafina ao meio para cultura de *Gluconacetobacter hansenii*. A parafina foi removida posteriormente. No *scaffold* de CB microporoso e nanoporoso (controle) foram cultivadas células osteoprogenitoras MC3T3-E1. A nova configuração do *scaffold* melhorou a penetração das células no *scaffold* e a viabilidade celular na membrana de CB. Este estudo mostrou que a CB microporosa é um biomaterial atraente como um *scaffold* futuro para aplicações na regeneração óssea (Zaborowska, Bodin *et al.*, 2010; Brackmann, Zaborowska *et al.*, 2011).

Com o objetivo de formar dutos de CB para utilização de desvios urinários, Bodin e colaboradores (2010) sintetizaram *scaffolds* microporosos de CB com vários tamanhos de poros, preparados pela adição de partículas de parafina de diversos tamanhos (90 e 150 μm , 150 e 300 μm e 300 e 500 μm) na fermentação da *Gluconacetobacter hansenii* (Figura 8).

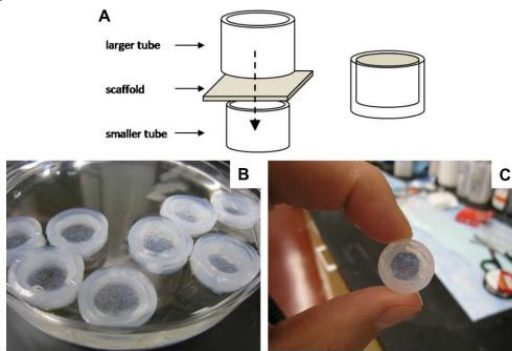


Figura 8 - Scaffolds em configuração de tubos de silicone. (A) O scaffold é colocado sobre o tubo de silicone menor e fixado com um tubo de silicone maior. O resultado é apresentado na imagem (B e C). Retirado de (Bodin, Bharadwaj *et al.*, 2010).

Como Backdahl e colaboradores relataram em 2008, eles acrescentaram cera de parafina e partículas de amido de vários tamanhos na cultura de bactéria. Desta forma foram preparados *scaffolds* de CB de diferentes morfologias. As partículas de parafina foram incorporadas ao longo do *scaffold*, enquanto que as partículas de amido foram

encontradas somente na área externa deste (Backdahl, Esguerra *et al.*, 2008). Após sete dias de cultura os tubos de CB foram colhidos e purificados até que toda a parafina fosse retirada, e então foram cortados e abertos para formar uma folha de polímero com 5 mm de espessura (**Figura 8**) (Liu, Bharadwaj *et al.*, 2009). Células-tronco derivadas do sistema urinário humano (USC) foram induzidas para se diferenciarem em células musculares lisas e uroteliais (SMC) e então semeadas sob a CB em condições de cultivo estática e dinâmica (10 ou 40 rpm). As células uroteliais e SMC derivadas da USC formaram multicamadas na superfície do *scaffold* de CB e algumas células infiltraram-se nele. As construções do *scaffold* USC/CB foram implantadas em ratos atímicos (não possuem o timo), mostrando que as células se diferenciaram e expressaram marcadores uroteliais e SMC. Os resultados indicam que este sistema de cultura em *scaffold* porosos de CB oferece condições favoráveis para a diferenciação das USC e pode auxiliar no desenvolvimento de tecido de dutos urinários, o que seria particularmente útil para a reconstrução urinária (Bodin, Bharadwaj *et al.*, 2010).

Em relação aos trabalhos relatados pode-se observar que há uma necessidade de maiores estudos das modificações *in situ* da CB, pois poucos trabalhos foram descritos, como visto no **Quadro 2**, todos tiveram o enfoque da modificação na porosidade e a potencial aplicação da CB modificada se concentrou na regeneração óssea e urinária.

Quadro 2 - Resumo das modificações da CB realizadas *in situ*.

Bactéria	Cultura	Material	Modificação	Potenciais Aplicações	Referência
<i>G. Sacchari-vorans</i>	Estático	Hidroxia patita	Porosidade	Biomédica e Regeneração Óssea	(Grande, Torres <i>et al.</i> , 2009; Saska, Barud <i>et al.</i> , 2011)
<i>G. hansenii</i>	Dinâmico	Bolachado-mar	Porosidade	Regeneração Óssea	(Barreiro, Recouvreur <i>et al.</i> , 2010)
<i>G. hansenii</i>	Estático	Parafina	Porosidade	Regeneração Óssea e Reconstrução Urinária	(Bodin, Bharadwaj <i>et al.</i> , 2010; Zaborowska, Bodin <i>et al.</i> , 2010; Brackmann, Zaborowska <i>et al.</i> , 2011)

2.3.2 Modificações Morfológicas

Tradicionalmente a CB é produzida em culturas estáticas utilizando bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, que produz uma membrana (folha) de celulose na superfície do meio de cultivo. O processo de produção é muito simples, de baixo custo, e extensivamente utilizado (Masaoka, Ohe *et al.*, 1993; Jonas e Farah, 1998). A CB produzida em cultura estática já foi aplicada para o tratamento de vários tipos de lesões. As folhas de CB foram usadas como barreira para a regeneração dos tecidos periodontais (Novaes e Novaes, 1993), para a reparação de defeitos abdominais (Falcao, Evencio Neto *et al.*, 2008) e como um substituto da dura-máter (Mello, Feltrin *et al.*, 1997). Feridas crônicas e queimaduras também foram tratadas com folhas de CB (**Figura 9**) (Fontana, De Souza *et al.*, 1990; Czaja, Krystynowicz *et al.*, 2006). Porém, poucas formas morfológicas diferentes (mudança somente estrutural) daquelas conseguidas em cultura estática (folha) da CB são relatadas na literatura.



Figura 9 - Curativo de celulose bacteriana aplicada em uma mão com ferimento. Retirado de (Czaja, Krystynowicz *et al.*, 2006).

Sabe-se que quando a CB é produzida em condições de cultura agitada ela possui algumas características diferentes daquelas produzidas em condições estáticas (Schramm e Hestrin, 1954; Dudman, 1959; Yoshinaga, Tonouchi *et al.*, 1997). A CB produzida em cultura agitada tem um menor grau de polimerização e uma menor cristalinidade em comparação com a produzida em cultura estática (Watanabe, Tabuchi *et al.*, 1998). Porém, a morfologia microscópica da estrutura da rede é semelhante em ambos os casos (Watanabe, Tabuchi *et al.*, 1998). Além disso, quando cultivada estaticamente uma película

de CB é acumulada na superfície do meio de cultura; já em cultivo agitado muitas partículas de diferentes tamanhos (10 μm a 1 mm) e formas (esféricas, estreladas e filamentosas) ficam dispersas no meio (Schramm e Hestrin, 1954; Czaja, Romanovicz *et al.*, 2004; Czaja, Young *et al.*, 2007; Zhu, Jia *et al.*, 2011). A CB esférica (**Figura 10**) produzida a partir de método dinâmico é translúcida, solta, porosa, possui uma estrutura de rede hidrofílica e ocorre o aumento da sua área de superfície específica com a diminuição do seu diâmetro esférico, de modo que pode ser usada como um transportador de vários tipos de substâncias (Svensson, Nicklasson *et al.*, 2005).

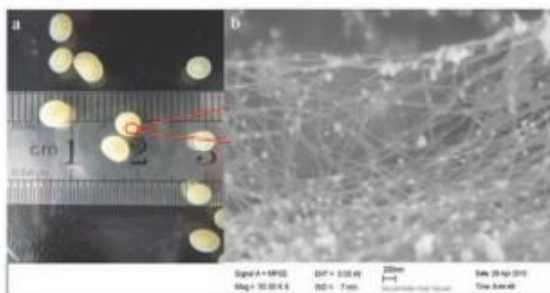


Figura 10 - Macro e micro morfologia das esferas de celulose bacteriana. Retirado de (Zhu, Jia *et al.*, 2011).

Utilizando essa estratégia de produzir CB em cultura agitada, Recouvreux e colaboradores sintetizaram grandes corpos tridimensionais de CB, chamados de *cocoons* (**Figura 11**). O estudo da microestrutura interna destes corpos macroscópicos revelou que estes são compostos por nanofibras de celulose produzidas de forma aleatória e dispersas nas três dimensões. Os *cocoons* são delimitados por uma membrana semi-permeável com espessuras entre 0,2 e 2 mm. Células endoteliais foram semeadas nos corpos e incubadas durante 7 dias. As células cresceram e migraram para a parte interna da estrutura (Recouvreux, 2008; Recouvreux, Rambo *et al.*, 2011). Baseada nessa estrutura Berti e colaboradores realizaram a endotelização dos metavasos da macroestrutura da CB em 30 dias de cultivo de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) no interior dos vasos. O *cocoon* vascularizado mostrou ser uma plataforma promissora para o desenvolvimento de tecidos ou órgãos vascularizados, por permitir a endotelização, que compreende uma das etapas mais críticas dos processos *in vitro* (Berti, 2012).

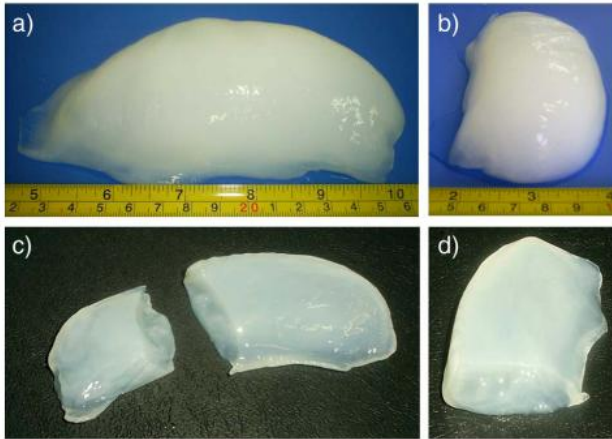


Figura 11 - Fotografias dos cocoons: (a) vista lateral, (b) vista superior frontal, (c) cocoon seccionado, vista lateral superior, e (d) cocoon seccionado, vista frontal superior. Retirado de (Recouvreux, Rambo *et al.*, 2011).

Outra forma morfológica da CB que vem sendo estudada para aplicações biomédicas é a forma tubular, essa forma tem sido sugerida para ser utilizada como um substituto de vasos sanguíneos (Yamanaka, 1990; Klemm, Schumann *et al.*, 2001) e para a regeneração de nervo (Klemm, Heublein *et al.*, 2005). A utilização de enxertos vasculares de CB foi relatada recentemente (Schumann, Wippermann *et al.*, 2009; Wippermann, Schumann *et al.*, 2009). Bodin e colaboradores desenvolveram um biorreator vertical, onde tubos de silicone são usados como molde para a formação da membrana de CB. Estes tubos auxiliam na difusão do oxigênio para as bactérias (Bodin, Backdahl *et al.*, 2007; Bodin, Concaro *et al.*, 2007; Backdahl, Risberg *et al.*, 2011). A morfologia dos tubos revelou que todos tinham o lado externo mais poroso do que o lado interno e a secção transversal indicou que os tubos são constituídos por camadas, e que a quantidade de camadas e o rendimento da celulose aumenta com o aumento da proporção de oxigênio (**Figura 12**). Células endoteliais foram cultivadas nos tubos, onde formaram uma camada confluyente após 7 dias (Bodin, Backdahl *et al.*, 2007).

Oliveira e colaboradores desenvolveram um aparato para a produção desses vasos artificiais à base de CB, assim como a produção, caracterização e estudo da degradabilidade *in vitro* desses vasos em ensaio com fluidos que simularam condições fisiológicas. Como resultados não houve mudanças estruturais aparentes e características de

degradação polimérica nas análises em MEV, tão menos presença de glicose nos líquidos de imersão. Os resultados caracterizaram que não houve degradação nas amostras durante o período de 20 semanas (Oliveira, 2011).

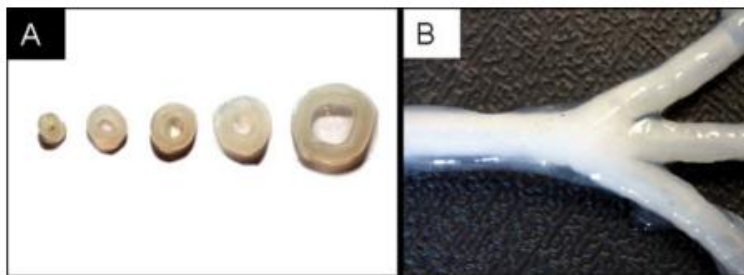


Figura 12 - Imagem de tubos de celulose bacteriana com diferentes diâmetros internos (A). Tubo ramificado de CB fermentado em tubo de silicone ramificado (B). Retirado de (Bodin, Backdahl *et al.*, 2007).

2.4 DISPOSITIVOS 2D *VERSUS* 3D E SUAS APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual (ET) requer um *scaffold* mecanicamente estável e biocompatível que permita a adesão e proliferação celular e que a célula consiga preservar propriedades específicas (Jagur-Grodzinski, 2006; Moroni, Schotel *et al.*, 2006). Portanto, *scaffolds* fabricados por técnicas de ET devem imitar as propriedades biomecânicas do tecido ou órgão a ser regenerado. Para atender a esses requisitos, o desenvolvimento de *scaffolds* tridimensionais (3D) na ET continua a ser um grande desafio em termos de *design*, modelagem e fabricação.

A CB é um biomaterial que pode formar estruturas macroscópicas produzidas de forma programada para uso como *scaffold* ou como dispositivo de liberação de fármacos (Yang, Leong *et al.*, 2001; Tang, Wang *et al.*, 2006), ou seja, permite a construção de dispositivos tridimensionais (3D), os quais podem ser utilizados nessas aplicações (Klemm, Schumann *et al.*, 2001; Svensson, Nicklasson *et al.*, 2005; Klemm, Schumann *et al.*, 2006; Tang, Wang *et al.*, 2006; Wan, Hutter *et al.*, 2006; Czaja, Young *et al.*, 2007; Shezad, Khan *et al.*, 2009).

Na ET o estudo das interações entre células e *scaffolds* biopoliméricos é de grande importância. Porém, muitos desses biopolímeros são normalmente tratados como *scaffolds* uniformes, bidimensionais (2D), onde a ancoragem de entidades biologicamente ativas (moléculas e células) em geral ocorre na superfície do material (Lauffenburger e Horwitz, 1996; Ridley, Schwartz *et al.*, 2003; Dobereiner, Dubin-Thaler *et al.*, 2005). A migração celular, em específico, é de interesse fundamental no estudo e desenvolvimento da ET. A migração das células desempenha um papel crucial em muitos sistemas biológicos e sua concepção requer uma compreensão não só da base química e biológica a nível celular ou tecidual, mas também da base mecânica e da geração de forças nas células responsáveis pela migração celular (Wakatsuki, Kolodney *et al.*, 2000; Shreiber, Barocas *et al.*, 2003; Dickinson, Caro *et al.*, 2004).

A cultura celular 2D é comumente utilizada para estudar a função e o comportamento das células e proporciona um método básico para explorar mecanismos biológicos, diferenciação celular e eficácia terapêutica antes de se passar para modelos *in vivo* mais complexos. No entanto, as células cultivadas em modelos 2D tradicionais não fornecem uma representação precisa das células em seu ambiente natural, pois faltam as informações encontradas no tecido nativo 3D (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Schmeichel e Bissell, 2003). Os estudos da migração celular *in vitro* realizados sobre superfícies 2D levaram a uma compreensão conceitual (Lauffenburger e Horwitz, 1996; Ridley, Schwartz *et al.*, 2003; Dobereiner, Dubin-Thaler *et al.*, 2005) e computacional (Dimilla, Barbee *et al.*, 1991; Mogilner e Edelstein-Keshet, 2002; Gracheva e Othmer, 2004; Rubinstein, Jacobson *et al.*, 2005) desse mecanismo. No entanto, esses modelos para a migração em superfícies 2D não dão conta da complexidade da migração através de um material 3D (Klein, Dressel *et al.*, 1991; Boudreau e Bissell, 1998; Friedl e Brocker, 2000; Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Ingber, 2002; Griffith e Swartz, 2006; Methe, Hess *et al.*, 2008; Fan, Gong *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos que compararam o comportamento das células em matrizes 2D e 3D revelaram diferenças na morfologia celular (Elsdale e Bard, 1972; Friedl e Brocker, 2000), na migração, na aderência e na sinalização (Ravanti, Heino *et al.*, 1999; Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Daley, Peters *et al.*, 2008; Doyle, Wang *et al.*, 2009; Hakkinen, Harunaga *et al.*, 2011). Esses resultados estabeleceram a importância da dimensionalidade da matriz, isto é, vantagens da matriz 3D contra a matriz 2D.

Vários fatores no microambiente celular fornecem sinais importantes para as células, incluindo interações com as células vizinhas e com a MEC (**Figura 13**). A MEC é uma composição heterogênea de proteoglicanos, proteínas e moléculas de sinalização que era conhecida originalmente pelo seu papel em fornecer suporte estrutural para as células e como um meio para a migração celular. Investigações recentes sobre a MEC esclareceram o seu papel. A MEC não é somente um suporte inerte, mas um componente ativo na sinalização celular (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Lund, Yener *et al.*, 2009). O ambiente celular 3D complexo fornece sinais mecânicos e bioquímicos que guiam as funções das células. Os componentes da MEC ditam a rigidez da matriz e do tipo de aderência célula-matriz. A composição da matriz também determina a facilidade com que os nutrientes irão difundir para os tecidos e a capacidade das células migrarem através da matriz (Owen e Shoichet, 2010).

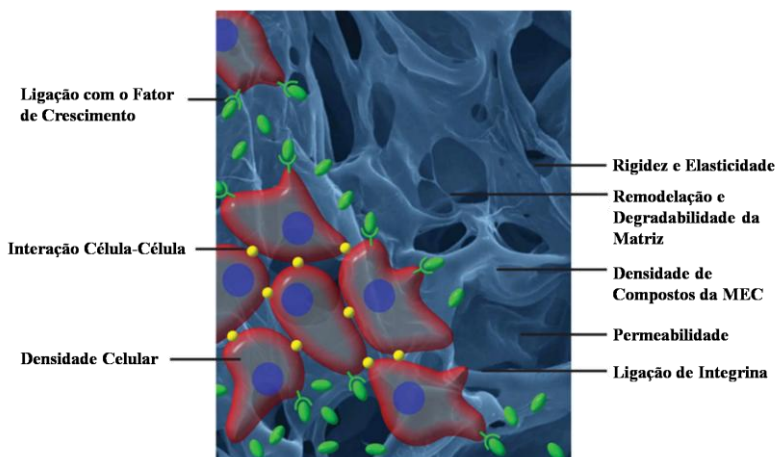


Figura 13 - Ambiente celular 3D complexo, o qual fornece sinais mecânicos e bioquímicos que guiam as funções das células. Fatores que fornecem sinais importantes para as células, incluindo fatores não-estruturais, tais como a densidade celular, as interações célula-célula e a sinalização de proteínas que são importantes para guiar a diferenciação e função celular.

Adaptado de (Owen e Shoichet, 2010).

Modelos atuais 3D são feitos a partir de polissacarídeos, colágeno, biomateriais sintéticos, esferóides de outras células, peptídeos, fragmentos de células ou a partir da MEC descelularizada de tecidos vivos (Yamada e Cukierman, 2007). Há uma série de revisões que discutem estes *scaffolds* naturais e sintéticos (Barnes, Sell *et al.*, 2007;

Madurantakam, Cost *et al.*, 2009; Tibbitt e Anseth, 2009; Shoichet, 2010). Entre os *scaffolds* atualmente em uso, a maioria são simples ou complexos. Matrizes simples incluem polímeros sintéticos tais como poli(etileno glicol) e poli(álcool vinílico), ou polímeros naturais como a quitosana e o colágeno. Como estes *scaffolds* são frequentemente efetuados a partir de apenas um ou dois componentes, as propriedades físico-químicas podem ser controladas; no entanto, muitos destes polímeros têm reconhecimento celular limitado e, por conseguinte, a adesão natural célula-matriz pode ser limitada ou completamente ausente. Qualquer variação na adesão irá alterar os mecanismos de sinalização, que são importantes para muitos processos celulares. No outro extremo estão as matrizes complexas como o Matrigel™ (Kleinman e Martin, 2005) ou o tecido reconstituído (Choi, Yang *et al.*, 2009). Matrigel™ é o nome comercial para uma mistura de proteínas segregadas por células de sarcoma de rato. Esta mistura se assemelha o complexo ambiente extracelular encontrada em muitos tecidos e é utilizado como um substrato para a cultura de células. Estes *scaffolds* fornecem fatores que impactam a função das células; no entanto, a complexidade inerente destes *scaffolds* faz com que seja difícil compreender a sinalização celular. A variabilidade lote para lote dificulta a reprodutibilidade dos experimentos. Problemas como biocompatibilidade impedem a implantação dos *scaffolds* em pacientes humanos e as propriedades mecânicas destes *scaffolds* não são facilmente manipuladas. Como tal, o efeito direto destes atuais substitutos da MEC no comportamento das células permanece ambíguo. A valorização da complexidade da resposta celular à sinalização da MEC tem estimulado o desenvolvimento de *scaffolds* 3D que imitam uma gama de propriedades da MEC.

Em contraste com o caso de matrizes 2D, em uma MEC 3D as forças geradas por uma célula em movimento são transmitidas sobre toda a superfície de uma célula em contato com a MEC circundante (Klein, Dressel *et al.*, 1991; Cukierman, Pankov *et al.*, 2001). Fatores bioquímicos (distribuição celular), históricos (impedimento por fibras da matriz), e os mecânicos (rigidez das fibras da matriz) devem ser levados em conta (Raeber, Lutolf *et al.*, 2005), pois esses podem afetar a migração celular em níveis múltiplos (Zaman, Kamm *et al.*, 2005). Outro fator importante é que as células no centro dos *scaffolds* 3D ainda experimentam condições limitadas de oxigênio, que seria naturalmente fornecido pelos principais vasos sanguíneos do tecido hospedeiro e que permanecem viáveis ao fornecimento de sangue por um tempo limitado (Lokmic, Stillaert *et al.*, 2007). Entretanto, *scaffolds* à base de hidrogel,

em comparação com *scaffolds* em estado sólido, oferecem uma estrutura com permeabilidade suficiente para transferir oxigênio e outros nutrientes em formas solúveis (Drury e Mooney, 2003). Os hidrogéis possuem porosidade natural e têm elevada viabilidade celular em comparação com os *scaffolds* sólidos (Drury e Mooney, 2003). Portanto, para a compreensão dos mecanismos subjacentes pelos quais as células migram *in vivo* é necessário estudar o movimento das células em ambiente de culturas 3D.

Nos últimos anos houve um aumento dos estudos experimentais sobre o comportamento e migração celular em matrizes 3D (Friedl e Brocker, 2000; Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Cukierman, Pankov *et al.*, 2002; Lutolf, Lauer-Fields *et al.*, 2003; Shreiber, Barocas *et al.*, 2003). Os modelos matemáticos e os estudos teóricos também têm melhorado a compreensão desse comportamento (Dimilla, Barbee *et al.*, 1991; Gracheva e Othmer, 2004; Rubinstein, Jacobson *et al.*, 2005).

As células cultivadas em microambientes 3D muitas vezes apresentam diferenças fisiológicas daquelas cultivadas em superfícies planas (Cukierman, Pankov *et al.*, 2001; Abbott, 2003). Modelos de tumor, por exemplo, têm demonstrado marcadamente eficácia melhorada quando cultivados em sistemas 3D que promovem a organização das células em microestruturas observadas *in vivo* (Debnath e Brugge, 2005; Fischbach, Chen *et al.*, 2007; Feder-Mengus, Ghosh *et al.*, 2008). A fim de explorar o efeito que ambientes 3D têm sobre o comportamento das células, uma variedade de *scaffolds* foram utilizados incluindo hidrogéis porosos (Cushing e Anseth, 2007), malhas de fibras e substratos poliméricos (Yang, Leong *et al.*, 2001).

Hakkinen e colaboradores (2011) apresentaram um estudo comparativo e quantitativo da influência de quatro matrizes 2D e 3D diferentes na morfologia, migração e adesão. Eles quantificaram parâmetros de adesão e migração celular de fibroblastos em *scaffolds* de colágeno do tipo I, fibrina ou extrato de membrana basal. Foi mostrado que os fibroblastos migraram mais rapidamente em células derivadas da matriz de colágeno 3D (Hakkinen, Harunaga *et al.*, 2011). Já Jamal e colaboradores (2010) adaptaram uma estratégia de automontagem para a construção de *scaffolds* celulares 3D que dirigiram o crescimento de fibroblastos em três geometrias: cilindros, espirais e folhas dobradas bidirecionalmente. Eles demonstram os efeitos desses fatores geométricos tridimensionais no comportamento de células (**Figura 14**). Os fibroblastos se mantiveram viáveis em todo o tempo de cultivo em todas as formas estudadas (Jamal, Bassik *et al.*, 2010).

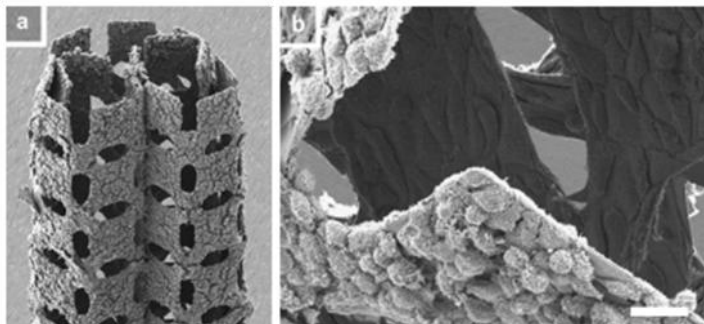


Figura 14 - Micrografias de fibroblastos cultivados sobre um *scaffold* cilíndrico após 5 dias de cultura. (a) Uma camada confluenta de células recobriu todo o *scaffold*. (b) Aumento de escalado *scaffold* mostrando que os fibroblastos aderiram tanto dentro como fora do *scaffold*. Barras de escala são: (a) de 150 μm e (b) de 30 μm . Retirado de (Jamal, Bassik *et al.*, 2010).

As células encontram-se naturalmente em microambientes 3D. A cultura de células dentro de um *scaffold* 3D fornece uma maneira mais precisa de imitar esses microambientes, proporcionando uma vantagem sobre os métodos tradicionais de cultura em 2D usando poliestireno (Sun, Jackson *et al.*, 2006). Enquanto a cultura de tecidos em poliestireno 2D foi utilizada para a maioria das experiências de cultura de células, *scaffolds* 3D podem mimetizar de forma mais estreita o microambiente encontrado *in vivo*, permitindo o estabelecimento mais preciso do comportamento celular no meio, que possui propriedades bioquímicas e mecânicas semelhantes às do tecido que se quer imitar (Sun, Jackson *et al.*, 2006). Uma pequena variedade de *scaffolds* de origem natural e sintética tem sido investigada como ambientes 3D para suportar o crescimento das células de fibroblastos (Jamal, Bassik *et al.*, 2010; Hakkinen, Harunaga *et al.*, 2011). *Scaffolds* sintéticos podem ser sintetizados para se ter uma maior gama de propriedades mecânicas e químicas e têm frequentemente, uma maior reprodutibilidade.

Portanto, faz-se necessário o entendimento das interações entre células e biomateriais no desenvolvimento de novos materiais para cultura de células *in vitro* ou implantes *in vivo*. Uma comparação sistemática do comportamento das células em diversas matrizes 3D é necessária para identificar as respostas morfológicas e biológicas, incluindo a natureza da adesão célula-matriz.

2.5 MATRIZES COMPARTIMENTALIZADAS E SUAS APLICAÇÕES NA ENGENHARIA TECIDUAL

Além do uso de matrizes compartimentalizadas no estudo da migração celular, podem ser destacadas sua utilização em sistemas de liberação de fármacos. As matrizes poliméricas compartimentalizadas para aplicações biológicas, estudadas inicialmente por Decher (Decher, Hong *et al.*, 1992), são de grande interesse para o campo da liberação dita controlada de fármacos (Qiu, Chidambaram *et al.*, 1998). A incorporação do fármaco, durante ou após a fabricação do dispositivo e seu mecanismo de liberação dependem das propriedades de permeabilidade e porosidade da membrana, do grau de inchaço dos filmes, da interação das moléculas do fármaco com o material, do tamanho da molécula do fármaco e do tipo de multicamada (Mehrotra, Lynam *et al.*, 2010b).

Mehrotra e colaboradores (Mehrotra, Lynam *et al.*, 2010a) demonstraram pela primeira vez a utilização de uma matriz compartimentalizada de um hidrogel de agarose na liberação controlada de proteína com um mês de duração. Entretanto, há poucos trabalhos relatados na literatura utilizando dispositivos compartimentalizados (Conte, Maggi *et al.*, 1993; Colombo, Cardona *et al.*, 1996; Chidambaram, Porter *et al.*, 1998; Qiu, Chidambaram *et al.*, 1998; Streubel, Siepmann *et al.*, 2000; Sershen e West, 2002; Mehrotra, Lynam *et al.*, 2010a), mostrando assim a importância do estudo e descoberta de novos dispositivos compartimentalizados que possam ser utilizados como dispositivos de liberação de fármacos e também como *scaffolds* na engenharia tecidual.

**CAPÍTULO 3 – HIDROGÉIS DE CELULOSE BACTERIANA
MODIFICADOS PELO MEIO DE CULTIVO**

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) produzida pela *Gluconacetobacter hansenii* é um biopolímero promissor para as aplicações biomédicas. A fim de melhorar as propriedades da CB e expandir a sua utilização como substrato para as aplicações de engenharia de tecidos como biomembranas, glicose ou dextrina foram adicionados ao meio de cultura contendo manitol, em cultura estática (CBGI e CBDe, respectivamente). As imagens de MEV mostraram que houve modificação da densidade das fibras e da porosidade em ambos os lados das membranas de CB. Ambas as modificações diminuíram a área superficial específica, a capacidade de retenção de água (CRA), a taxa de reidratação (TR), os resultados do FTIR-ATR revelaram que não houve nenhuma alteração na estrutura química da CB e os resultados de TGA mostraram que houve um aumento na estabilidade térmica da CBDe. A modificação com a adição de glicose no meio de cultura (CBGI) influenciou positivamente o comportamento dos fibroblastos, aumentando a adesão e a proliferação celular quando comparado com o controle.

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Modificações *In Situ*

A busca pela regeneração de tecidos através de *scaffolds* bioartificiais requer o desenvolvimento de novos materiais com alta biocompatibilidade e melhores características físico-químicas. O desenvolvimento de um *scaffold* curativo pretende imitar microambientes apropriados para a adesão e proliferação celular por meio da construção de uma estrutura de microarquitetura capaz de induzir ou inibir sinais físicos, químicos e biológicos dentro de uma microestrutura que controla o comportamento das células (Kniazeva e Putnam, 2009). Recentes avanços nos biomateriais e suas aplicações biomédicas, particularmente, as aplicações de engenharia tecidual, estão revelando o grande potencial de diversos polissacarídeos no desenvolvimento de novas classes de dispositivos médicos. Aqueles que

requerem alguma função e/ou, de alguma forma, uma interface material-célula controlável.

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero único. É um composto poli(celobiose), que consiste em cadeias lineares de β -D-glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. Isto significa que a sua eventual degradação produz combustível celular, isto é, glicose. CB é um produto excretado por várias bactérias, incluindo a *Gluconacetobacter hansenii*, mas o que a torna única é a sua variedade de formas, densidade de fibras e outras propriedades controláveis que podem regular o destino celular. A CB é um biomaterial fascinante, sendo um candidato atraente como *scaffold* 2D/3D para as células (Lina, Yue *et al.*, 2011; Zahedmanesh, Mackle *et al.*, 2011; Pértile, R., Moreira, S. *et al.*, 2012; Pértile, R. a. N., Moreira, S. *et al.*, 2012), permitindo a formação de tecido novo devido à sua alta hidrofiliabilidade e biocompatibilidade, que não promove uma fibrose significativa quando implantada (Helenius, Backdahl *et al.*, 2006). Foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos em 1996 para aplicações incluindo curativos (Czaja, Krystynowicz *et al.*, 2006). Além disso, a produção da CB é relativamente simples, com baixo custo e preenche todos os requisitos importantes para o sucesso do desenvolvimento de construções de celulose bacteriana na ET (CCBET).

Estudos recentes têm demonstrado modificações estruturais da CB visando principalmente alterações na porosidade, realizadas pela adição *in situ* de compostos diferentes para gerar CCBET adequadas para diferentes aplicações biomédicas (Barreiro, Recouvreur *et al.*, 2010; Bodin, Bharadwaj *et al.*, 2010; Zaborowska, Bodin *et al.*, 2010; Brackmann, Zaborowska *et al.*, 2011; Saska, Barud *et al.*, 2011). A estrutura química, o arranjo de fibras e o método de processamento determinam as propriedades físicas e funcionais do biomaterial final. A microarquitetura de nanofibras da CB é uma característica essencial desse polissacarídeo, uma vez que a seu arranjo de fibras 3D é semelhante à matriz extracelular nativa, a qual confere à CB importantes propriedades funcionais que influenciam as interações células-nanofibras (Hollister, 2005). Propriedades, tais como a rugosidade e a porosidade da superfície destes materiais usados na cultura de células parecem influenciar significativamente os eventos biológicos, tais como a adesão e proliferação celular. Estas têm sido estudadas por diversos grupos de pesquisa (Backdahl, Helenius *et al.*, 2006; Hu, Park *et al.*, 2011; Hu e Catchmark, 2011), embora pouca atenção tem sido dada à influência da composição do meio de cultura na microestrutura da superfície final na interação celular. Além disso, o tamanho e a orientação dos poros, a microestrutura e o diâmetro de cada fibra do

scaffold influenciam no comportamento das células e estimulam a formação de um tecido novo (Zaborowska, Bodin *et al.*, 2010). De fato, estes estudos já demonstraram que o aumento da porosidade e rugosidade da superfície destes materiais pode melhorar a adesão e proliferação de células. O que não é tão óbvio é que a composição do meio de cultura pode influenciar nas propriedades ao ponto em que a adesão celular seja melhorada, dependendo da microarquitetura final do *scaffold*.

O tamanho das fibras, a área de superfície e a porosidade da CB não são absolutamente constantes e variam dentro de um determinado intervalo, de acordo com a atividade do organismo produtor, a composição dos meios de cultura e a fonte de carbono utilizado para a produção (Embuscado, Marks *et al.*, 1994; Ramana, Tomar *et al.*, 2000; Hutchens, Leon *et al.*, 2007; El-Saied, El-Diwany *et al.*, 2008; Mikkelsen, Flanagan *et al.*, 2009; Jung, Jeong *et al.*, 2010; Jung, Lee *et al.*, 2010; Tang, Jia *et al.*, 2010; Ruka, Simon *et al.*, 2012). Sabe-se que a composição dos meios de cultura afeta as várias propriedades da CB (Shezad, Khan *et al.*, 2010), embora a forma como o metabolismo e as atividades enzimáticas possam mudar devido a fonte de carbono utilizada não seja totalmente esclarecida. Também tem sido relatado que a adição de certos aditivos, incluindo ágar, carboximetilcelulose, celulose microcristalina, alginato de sódio, pectina, poliácridamida, xilana, nanotubos de carbono, quitosana, ácido glucurônico, glucomanana, uréia, hidroxipropilmetilcelulose, *Aloe vera* e xiloglucano no meio de cultura das bactérias produtoras causam variações nas propriedades da CB, tais como rendimento, morfologia, e cristalinidade (Ruka, Simon *et al.*; Ishida, Mitarai *et al.*, 2003; Joseph, Rowe *et al.*, 2003; Chen, Zou *et al.*, 2009; Huang, Chen *et al.*, 2010; Saibuatong e Phisalaphong, 2010; Huang, Chen *et al.*, 2011; Ul-Islam, Khan *et al.*, 2012).

Neste contexto, a fim de melhorar as propriedades da CB e expandir a sua utilização como substrato para a avaliação de células e suas aplicações na ET, membranas de CB foram produzidas, em meio de cultura com base em manitol, com a adição de glicose ou dextrina como modificadores de microarquitetura não-tóxicos da CB. A morfologia, adesão e proliferação de fibroblastos L929 foram então avaliados nestes biomateriais a fim de estudar as interações célula-biomaterial.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Produção de Celulose Bacteriana Modificada

Membranas de CB foram obtidas sem modificação, de modo a utilizá-la como controle (CBC). Membranas modificadas *in situ* foram obtidas pela adição de glicose (CBGI) e dextrina (CBDe) em meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono principal.

O meio de cultura utilizado para a produção das membranas de CB consistiu em manitol (25 g·L⁻¹), extrato de levedura (5,0 g·L⁻¹) e peptona (3,0 g·L⁻¹). Os compostos foram diluídos em 1 L de água destilada, o pH foi ajustado para 6,5 e, em seguida, a solução foi esterilizada por autoclavagem a 121 °C durante 20 minutos. Para a formação dos novos materiais, D-(+)-glicose (Sigma, Alemanha) (CBGI) e dextrina branca PA (Vetec, Brasil) (CBDe) foram adicionados ao meio de cultura, 100 e 50 g·L⁻¹, respectivamente, e agitou-se até dissolução total dos compostos. Prosseguiu-se com a esterilização por autoclavagem. Aos meios de cultura foram adicionados 20 % (v/v) de inóculo obtido a partir de uma cultura reserva de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. O cultivo ocorreu em condições estáticas a 30 °C durante sete dias em placas de cultura de 24 poços (TPP, Suíça), onde cada poço recebeu 500 µL de meio de cultura inoculado. Então, as membranas de CB foram removidas dos poços e lavadas com água destilada. De modo a remover as bactérias e eliminar o meio de cultura remanescente, as membranas foram mantidas em NaOH 0,1 mol·L⁻¹ a 50 °C por 24 h, seguido de lavagens sucessivas com água destilada até atingir pH neutro. Após a esterilização em autoclave, as membranas de CB foram mantidas sob refrigeração a 4 °C até serem utilizadas na cultura de células.

3.2.2 Caracterização da Celulose Bacteriana Modificada

3.2.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microestrutura das construções de CBC, CBGI e CBDe foram caracterizadas por MEV em um microscópio do modelo 5910 (JEOL, Japão). As membranas foram previamente congeladas (-80 °C durante 24 h) e depois liofilizadas (24 h). Para a análise de MEV das membranas com os fibroblastos foi necessário fixar as células nas membranas com uma solução de glutaraldeído 2,5 % e realizar três lavagens com tampão

fosfato-salino (PBS). As amostras foram desidratadas com soluções de etanol 30, 40, 50, 70, 90 e 100 % e então foram secas utilizando um secador por ponto crítico de CO₂ Balzers do modelo CPD 030 (Bal-Tec, Liechtenstein). As amostras foram metalizadas com ouro e as imagens de MEV foram realizadas com uma tensão de 15 kV.

3.2.2.2. Área Superficial Específica (ASE)

A fisissorção de nitrogênio foi realizada por um equipamento Brunauer-Emmett-Teller (BET), análise de área de superfície e analisador de tamanho de poro do modelo NOVA 2200E (Quantachrome, EUA). Antes da determinação, as massas das amostras liofilizadas foram colocadas em tubos de amostras e aquecidas a 90 °C em vácuo durante 1,5 horas para remover a umidade da superfície e outros contaminantes. A análise de BET foi realizada a pressão de vapor relativa entre 0,05 e 0,25.

3.2.2.3. Capacidade de Retenção de Água (CRA) e Taxa de Reidratação (TR)

Para medir a capacidade de retenção de água (CRA) as membranas foram imersas em água destilada durante um período de tempo suficiente para ocorrer o inchaço completo. As amostras foram retiradas com uma pinça e secas ligeiramente em papel absorvente para remover o excesso de água superficial e então pesadas ($m_{úmida}$). O material foi, em seguida, liofilizado e pesado (m_{seca}). A CRA das amostras foi calculada através da Eq. (1) (Shezad, Khan *et al.*, 2010).

$$CRA = \frac{m_{úmida} - m_{seca}}{m_{seca}} \quad (1)$$

Para a determinação da taxa de reidratação (TR), as amostras úmidas foram liofilizadas e pesadas (m_{seca}), então estas membranas secas foram imersas em água destilada (m/v = 1:4) até que a massa da amostra reidratada ($m_{reidratada}$) permanecesse constante (~ 8 h). A taxa de reidratação das membranas foi determinada pela Eq. (2) (Huang, Chen *et al.*, 2011).

$$TR = \frac{m_{reidratada} - m_{seca}}{m_{úmida} - m_{seca}} \times 100\% \quad (2)$$

Ambos os experimentos foram realizados com amostras de raio de 15,4 mm em triplicata e a temperatura ambiente.

3.2.2.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas das amostras liofilizadas foram realizadas utilizando um equipamento TGA 50 (Shimadzu, Alemanha). As amostras foram aquecidas em recipientes abertos de platina de 25 a 800 °C sob atmosfera de nitrogênio (20 mL·min⁻¹) a uma taxa de aquecimento de 10 °C·min⁻¹.

3.2.2.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros das membranas de CB liofilizadas foram registrados em um equipamento com refletância total atenuada (ATR) e cristal de ZnSe (Bruker, Alemanha). Os espectros de FTIR foram registrados no intervalo de comprimento de onda de 4000 a 600 cm⁻¹, com uma resolução de 4 cm⁻¹ e acumulação de 16 varreduras.

3.2.3 Ensaio de Viabilidade e Proliferação Celular

Fibroblastos L929 foram cultivados em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de penicilina/estreptomicina em atmosfera úmida, a 37 °C com 5 % de CO₂. Os fibroblastos foram removidos da placa com solução de tripsina, a suspensão foi centrifugada, então o meio foi removido e as células foram ressuspensas em meio de cultura para a realização da contagem em câmara de Neubauer (SP LABOR, Brasil). As membranas de CB controle (CBC) e as modificadas (CBGI e CBDe) foram transferidas para uma placa de cultura de 24 poços (TPP, Suíça). Para que as membranas permanecessem no fundo dos poços da placa de cultura, cilindros de vidro estéreis (com diâmetro exterior ajustado ao diâmetro interno dos poços) foram utilizados para segurá-las, estes vidros permaneceram na placa até o final de cada experimento. As células foram semeadas (10⁵ células/poço) do lado superior de cada

membrana (aquele formado em contato com o ar) e mantidas em câmara com 5 % CO₂ a 37 °C.

A análise da viabilidade e proliferação celular foi realizada em triplicata, pelo método colorimétrico MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio] a uma concentração de 1,90 mg·mL⁻¹. Foram analisados três pontos a cada 24 h. Para a realização do teste de MTS, o meio de cultura dos poços foi removido, as membranas foram lavadas com 500 µL de meio novo foram transferidas para uma nova placa de cultura. Então, foram adicionados 300 µL de meio novo e 60 µL da solução de MTS em cada poço. As amostras foram incubadas por 1 hora, após este período homogeneizou-se o meio de cada amostra e 100 µL de solução foram transferidos para uma placa de 96 poços. A absorbância foi lida em leitor de microplacas (Thermo placa TP leitor NM, China) a 490 nm. Fibroblastos em placa de cultura de poliestireno foram utilizados como controle padrão da viabilidade celular.

3.2.4 Avaliação da Adesão, Densidade e Morfologia Celular

A microscopia de fluorescência foi utilizada para a visualização da adesão, densidade e morfologia celular dos fibroblastos nas membranas de CB. Após 24 h de cultura, as amostras foram lavadas três vezes com solução de PBS, as células foram fixadas com formaldeído 3,7 % em PBS e permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 em PBS. Para visualizar os filamentos de F-actina as células foram coradas com o corante AlexaFluor 546 conjugado com faloidina (Molecular Probes, USA). O núcleo das células foi corado com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Molecular Probes, EUA). As amostras foram montadas em lâminas e então analisadas no microscópio de fluorescência do modelo Eclipse Ci-L (Nikon, Japão).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Produção e Caracterização da Celulose Bacteriana Modificada

A adição de glicose e dextrina no meio de cultura afetam diretamente a produção de fibras pela *G. hansenii* e estes compostos determinaram a morfologia da rede de celulose final, modificando a

densidade e porosidade da fibra em ambos os lados das membranas do hidrogel de CB.

No estado hidratado, as membranas formadas sobre a superfície do meio de cultura pela bactéria *G. hansenii* são um gel resistente, modelável, semitransparente e macroscopicamente homogêneas, em que o lado superior (de contato com o ar) é composto de uma rede de fibras densa, enquanto o lado inferior (em contato com o líquido) apresenta uma camada porosa gelatinosa (Klemm, Schumann *et al.*, 2001; Backdahl, Helenius *et al.*, 2006). Na **Figura 15** é mostrada as diferenças em termos de transparência da membrana CBGI em comparação com as membranas das CBDe e CBC.

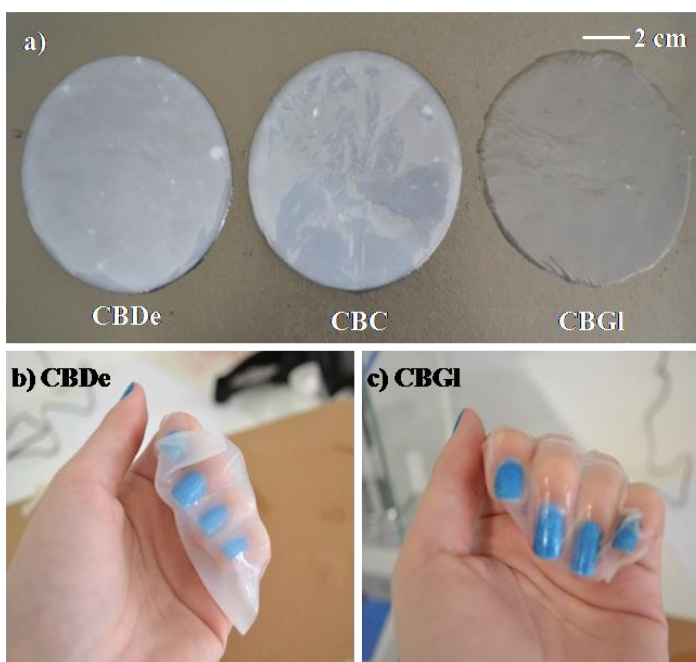


Figura 15 - a) Imagens das membranas de celulose bacteriana sintetizadas em placas de Petri. Membranas de celulose bacteriana resultantes da adição de dextrina (b) e glicose (c) no meio de cultura. As amostras são representativas de sete lotes de síntese independentes.

O manitol tem sido usado como uma fonte de carbono para a produção de celulose por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* permitindo uma elevada produtividade quando utilizado como substrato (Ramana, Tomar *et al.*, 2000; Hutchens, Leon *et al.*, 2007). Além disso, outros estudos mostraram que a síntese da CB é afetada pela fonte de

carbono presente no meio de cultura (Shezad, Khan *et al.*, 2010). A glicose é um monossacarídeo comumente usado como fonte de carbono no meio de cultura nutritivo para bactérias (Ramana, Tomar *et al.*, 2000; Hutchens, Leon *et al.*, 2007). Por outro lado, a dextrina é um polímero composto por unidades $\alpha(1-4)$ -D-glicose, produzido pela hidrólise parcial do amido e é um polímero de baixa massa molecular que tem sido utilizado para a produção de hidrogéis para o desenvolvimento de *scaffolds* na ET (Carvalho, Goncalves *et al.*, 2007; Carvalho, Coimbra *et al.*, 2009).

Parece haver alguma contradição na literatura sobre o papel das fontes de nitrogênio e carbono na estrutura da celulose. Sabe-se que as condições de cultivo, tais como volume de inoculação, tempo de cultura, disponibilidade de oxigênio e a fonte de carbono podem afetar significativamente a produção e as características da CB (Watanabe e Yamanaka, 1995; El-Saied, El-Diwany *et al.*, 2008; Jung, Jeong *et al.*, 2010; Jung, Lee *et al.*, 2010; Tang, Jia *et al.*, 2010). Outros estudos, por outro lado, relataram que o meio de cultura não pode afetar a estrutura da celulose (Mikkelsen, Flanagan *et al.*, 2009; Ruka, Simon *et al.*, 2012). Há vários trabalhos publicados envolvendo a inclusão de polímeros solúveis em água no meio de cultura (Ruka, Simon *et al.*; Ishida, Mitarai *et al.*, 2003; Joseph, Rowe *et al.*, 2003; Chen, Zou *et al.*, 2009; Huang, Chen *et al.*, 2010; Saibuatong e Phisalaphong, 2010; Huang, Chen *et al.*, 2011; Ul-Islam, Khan *et al.*, 2012). Alguns relatam que ocorreu somente a alteração da estrutura da celulose, enquanto que outros mostram que realmente os compostos foram incorporados nas fibras de CB durante a síntese. Ruka e colaboradores adicionaram poli-3-hidroxibutirato juntamente com hidroxipropilmetilcelulose e Tween 80 nos meios, e isto conduziu a mudanças na cristalinidade, no rendimento e na morfologia da CB (Ruka, Simon *et al.*). Ul-Islam e colaboradores também investigaram os efeitos das modificações estruturais da CB (Ul-Islam, Khan *et al.*, 2012). A modificação *in situ* da CB foi produzida pela adição de várias concentrações de ácido glucurônico α -ligado a oligossacarídeo no meio de cultura. Os resultados mostraram um arranjo denso de fibras e uma diminuição do tamanho e do volume de poro com o aumento da concentração. A capacidade de retenção de água (CRA) aumenta com o aumento do volume e tamanho dos poros nas amostras de CB modificadas *in situ* (Ul-Islam, Khan *et al.*, 2012).

Na **Figura 16** são mostradas as imagens do lado superior, lado inferior e uma vista sagital obtidas por MEV das membranas de CBC, CBGI e CBDe. Estas micrografias mostram a diferença da densidade de

fibras e da porosidade entre o lado superior e inferior das membranas de CBC e CBGI. O lado da superfície mais densa formado na interface entre o ar e o meio de cultura exibiu uma superfície rugosa e pouco porosa. No lado oposto, uma maior porosidade, com poros maiores, foi formada, tal como Backdahl, colaboradores e outros pesquisadores já relataram (Borzani, 1995; Klemm, Schumann *et al.*, 2001; Backdahl, Helenius *et al.*, 2006).

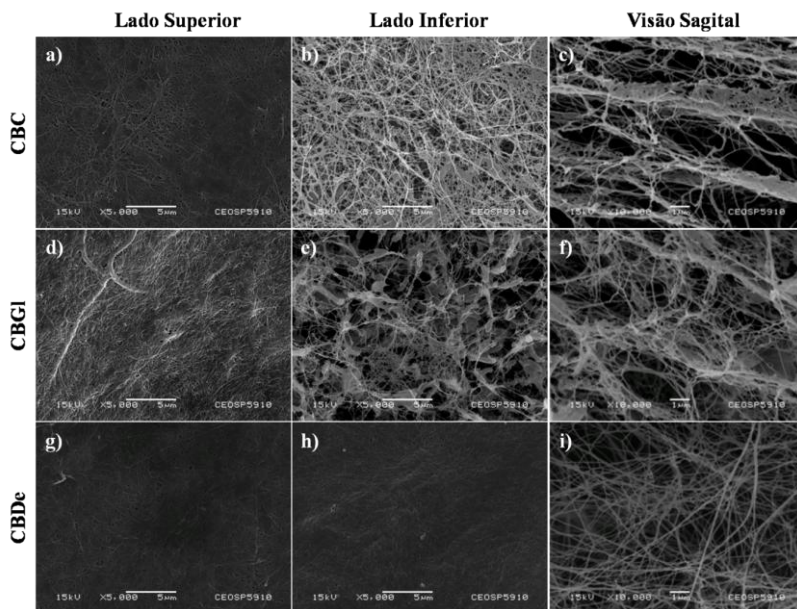


Figura 16 - Micrografias das membranas liofilizadas de celulose bacteriana: lado superior e inferior com ampliação de 5000x, e visão do corte sagital com ampliação de 10.000x.

Comparando os dois lados das superfícies nota-se que a porosidade é sempre maior no lado inferior do que no lado superior tanto para a CB controle como para as membranas modificadas com meio de cultura enriquecido. Além disso, a porosidade no lado inferior da CBC fica entre a porosidade da CBDe e da CBGI. Pode-se notar que o meio enriquecido com dextrina produz uma maior densidade e uma menor porosidade, nos lados superior e inferior da membrana em comparação com os lados da membrana com base em manitol (CBC), o efeito oposto a ser observado pelo meio enriquecido de glicose. Uma análise mais detalhada da microestrutura da membrana liofilizada de CBC (Figura 16a e b) utilizada como controle revelou uma rede

formada por fibras de celulose longas com uma densidade de fibras relativamente elevada.

A análise das membranas de CBGI (**Figura 16d e e**) revelou um arranjo mais desorganizado de fibras com maior porosidade quando comparado com as outras membranas, o que pode conferir vantagens na utilização de tais membranas para certas aplicações biomédicas, por exemplo, como curativo. A menor densidade de fibras e a elevada porosidade podem afetar o comportamento das células, aumentando a migração para o interior das membranas e também aumentando a difusão de nutrientes e de oxigênio para as células (Zaman, Kamm *et al.*, 2005; Lokmic, Stillaert *et al.*, 2007). Além disso, as membranas mais porosas podem facilitar a drenagem de líquido e a penetração de substâncias ativas no ferimento em caso da sua utilização como curativo. As membranas CBDe (**Figura 16g e h**) exibiram visualmente uma maior densidade de fibras e baixa porosidade do que o controle e a CBGI, em ambos os lados. No entanto, a parte interior das membranas (**Figura 16c, f e i**) apresentou porosidade mais elevada do que as suas respectivas superfícies superior e inferior. Em comparação com as suas superfícies externas existe uma ordem diferente de porosidade do que da visão do corte sagital: CBDe<CBGI<CBC, provavelmente devido à influência dos diferentes substratos sobre o mecanismo de síntese e disposição das fibras de CB.

Além da análise da microestrutura por MEV, a área superficial de BET foi analisada para avaliar o efeito dos diferentes substratos sobre a topologia de superfície. No geral, os resultados mostraram que ambas as modificações diminuíram o tamanho dos poros e a área superficial. A área superficial específica (ASE), a capacidade de retenção de água (CRA) e a taxa de reidratação (TR) das construções modificadas *in situ*, CBC, CBGI e CBDe são mostradas na **Tabela 1**. Pode-se notar que a área superficial da CBC é maior do que as outras amostras. A ASE da CB é 44 ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), a qual diminuiu para 31 ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) para CBGI e para 28 ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) para CBDe. Os resultados da ASE seguem uma tendência decrescente na seguinte ordem: CBDe<CBGI<CBC. Uma tendência semelhante para este parâmetro é também evidente a partir das micrografias da parte interna das membranas (**Figura 16c, f e i**). O aumento do número e tamanho dos poros resultou em uma área superficial aumentada (Gao, Wan *et al.*, 2011; Guo e Catchmark, 2012). A área superficial específica e a porosidade dependem do arranjo das fibras. Fibras dispostas estreitamente têm menor porosidade (CBGI e CBDe) e também menor ASE (Gao, Wan *et al.*, 2011; Guo e Catchmark, 2012). A área superficial específica mais baixa, no caso das amostras de CBGI e CBDe em comparação com a CBC pode ser

explicada em função da forte interação entre as cadeias de CB, que podem conduzir um enchimento mais compacto dos poros na matriz de CB e, portanto, ocorre uma redução de espaços vazios e impedimento parcial da superfície das fibras. Além disso, estas interações fortes podem juntar mais as fibras o que acarreta na redução do volume por unidade de massa de amostra, o que em última análise, conduz a uma diminuição na área de superfície.

Tabela 1 - Área superficial específica total (ASE), capacidade de retenção de água (CRA) e taxa de reidratação (TR) das construções de CB com meios enriquecidos com glicose (CBGI) e dextrina (CBDe) e seus respectivos desvios padrão.

Amostras	ASE ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	CRA ($\text{g H}_2\text{O} \cdot \text{g}^{-1}$)	TR 10 min (%)	TR 8 h (%)
CBC	44	286 ± 14	37,6 ± 4,9	60,3 ± 5,5
CBGI	31	222 ± 10	33,5 ± 3,1	46,6 ± 0,8
CBDe	28	190 ± 9	19,7 ± 6,7	36,8 ± 3,6

A capacidade de retenção de água para a CBC é 286 vezes a sua massa seca, sendo o maior valor entre as amostras. A CRA da CBGI foi de 222, enquanto que para CBDe foi de 190 vezes a sua massa seca. A partir da **Tabela 1**, pode-se observar que a CRA das amostras aumentam na ordem: CBDe < CBGI < CBC, corroborando com os resultados do BET. A variação na CRA destas amostras pode ser atribuída à sua respectiva porosidade, área superficial e tamanho das fibras (Yamanaka, Watanabe *et al.*, 1998). As moléculas de água estão fisicamente presas na superfície e no interior da matriz de CB constituída por fibras reticuladas. Se há muitos espaços vazios entre as fibras de CB, mais água pode sair ou penetrar e ser absorvida no material, o que implica que, quanto maior a área de superfície e maior o tamanho de poro, maior será a CRA das amostras (Guo e Catchmark, 2012).

A taxa de reidratação (TR) foi determinada para todas as amostras em 10 min e até a massa constante (~8 h). A desidratação aumenta o tempo de armazenagem e vida da CB, no entanto, a CB apresenta uma pobre taxa de reidratação após a secagem devido a elevada cristalinidade (Lin, Hsu *et al.*, 2009). A tendência da TR para as amostras é a mesma do que a observada para CRA e BET. Estes resultados podem ser explicados com base nas imagens de MEV das vistas sagitais (**Figura 16**) e da área de superfície das amostras. A interação entre as moléculas de água e a matriz de CB depende, principalmente, da disposição das fibras (Shezad, Khan *et al.*, 2010).

Estas fibras, quando dispostas em uma forma mais relaxada, se ligam às moléculas de água de forma mais eficiente, devido às fortes interações das ligações de hidrogênio (como na CBC) em comparação com as nanofibras dispostas mais firmemente, resultando em uma rede mais densa de celulose com menos espaço para absorver moléculas de água (CBDe). As fibras de CB estão mais frouxas com abundância de aberturas entre elas, como mostrado na **Figura 16b e e**, o que leva a uma maior área de superfície específica e, assim, uma maior CRA e TR. Além disso, as fibras de CBDe são mais entrelaçadas do que as fibras de CBC e CBGI o que pode explicar a menor ASE. Isto significa uma menor capacidade de formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água, o que resulta em uma menor TR.

No presente estudo, a CRA e a TR dos meios enriquecidos de CB mostram ser dependentes da natureza e da disposição das fibras do material na superfície e no interior da matriz, o que proporciona as diferenças nas características estruturais da CB, em especial na área de superfície. Deve ser enfatizado que a CRA e a TR são propriedades importantes dos materiais porque elas estão diretamente envolvidas na eficácia de dispositivos médicos tais como os curativos para feridas. A otimização da taxa de fluxo de umidade, provavelmente perto do nível fisiológico humano de cerca de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{hr}^{-1}$ (Spruit e Malten, 1966) parece ser um componente necessário de uma concepção adequada. O teor de umidade adequado pode acelerar o processo de cicatrização de feridas e proteger contra a contaminação (Ul-Islam, Shah *et al.*, 2011). Além disso, pode facilitar a penetração de substâncias ativas (entrega de fármacos) para dentro da ferida e permitir uma troca mais fácil e eficiente do curativo, sem danificar a pele recém-formada (Shezad, Khan *et al.*, 2010). Portanto, a determinação dos efeitos das modificações *in situ* na estrutura da CB, ou seja, melhorando o meio de cultura com diferentes fontes de carbono, se mostra uma questão fundamental que os biomateriais ou a ET devem considerar no desenvolvimento de um novo CCBET.

As curvas de TGA foram avaliadas para as membranas BCC, BCGL e BCDe, como são mostradas na **Figura 17**. A análise termogravimétrica foi conduzido para avaliar a estabilidade térmica e perfis de degradação dos compostos. A estabilidade térmica das amostras pode ser importante para algumas aplicações e pode fornecer algumas pistas sobre as interações das fibras de CB. Como é habitual, as amostras apresentaram uma pequena perda de massa a partir da temperatura ambiente até $100 \text{ }^\circ\text{C}$ (4–5 %), devido à perda de água. A CB mostra um segundo evento de perda de massa que é atribuído a um

processo de decomposição a temperaturas entre 327–370 °C, o qual resultou em uma perda de massa significativa (75–85 %). Entre 310–600 °C ocorre outra perda de massa. Este evento está associado a degradação da celulose, incluindo a desidratação, despolimerização, decomposição de unidades de glicose, seguida pela formação de um resíduo de carbono (2–6 %) (Barud, De Araujo *et al.*, 2008).

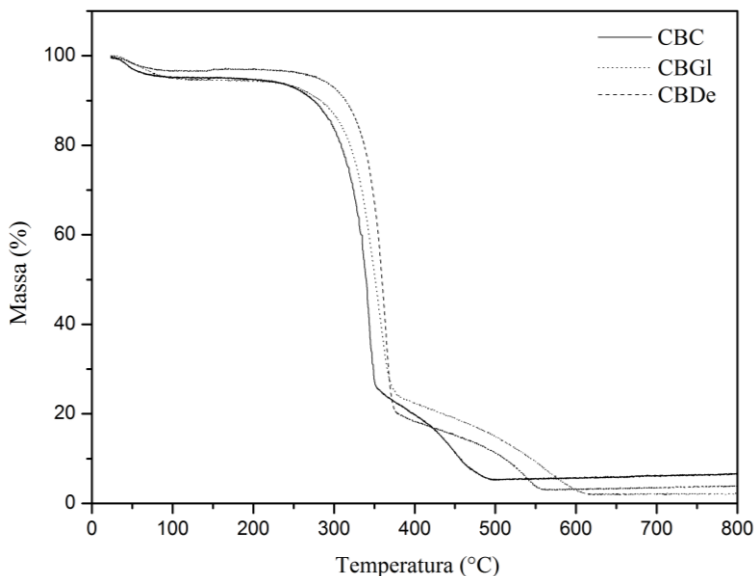


Figura 17 - Curvas de TGA: CBC (linha sólida), CBGI (linha tracejada) e CBDe (linha pontilhada).

As temperaturas de início (T_{onset}) observadas nas curvas de TGA revelaram que a estabilidade térmica das membranas de CB foram modificadas pela presença de dextrina e glicose no meio de cultura. Para a amostra de CBGI a T_{onset} foi de 327,5 °C, a qual se mostrou muito semelhante a T_{onset} da CBC que foi de 329,7 °C. Já para a amostra CBDe a T_{onset} aumentou para 342,6 °C, apontando assim que houve uma melhora na estabilidade térmica da CB quando é adicionado dextrina ao meio de cultivo contendo manitol.

Os espectros de FTIR-ATR podem ser vistos na **Figura 18**. A **Tabela 2** apresenta as bandas características de amostras de CB. Os espectros de CBGI, CBDe e CBC são muito semelhantes, indicando que as construções produzidas possuem a mesma estrutura química. Estas bandas são típicas de espectros de IR de celulose de origem bacteriana

(Yamamoto, Horii *et al.*, 1996). Além disso, como esperado, todos os espectros mostram as bandas características de celulose I_α, bandas de absorção próximas de 3240 e 750 cm⁻¹ (Yamamoto, Horii *et al.*, 1996). As posições das bandas no espectro de FTIR-ATR para as três amostras de CB foram encontradas no mesmo intervalo de comprimento de onda e não mostraram qualquer diferença significativa.

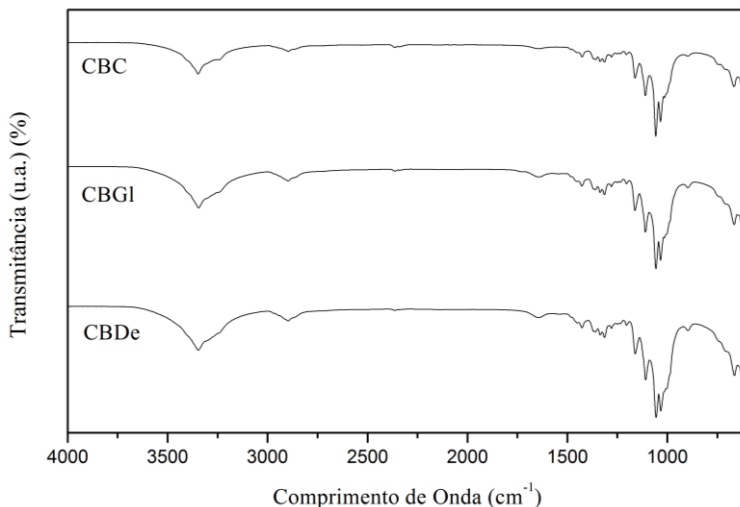


Figura 18 - Espectros de FTIR-ATR da celulose bacteriana original (CBC) e da celulose bacteriana produzida por adição de glicose (CBGl) e dextrina (CBDe) ao meio de cultura contendo manitol.

Tabela 2 - Atribuição das bandas dos espectros de FTIR-ATR de celulose bacteriana original (CBC) e das amostras produzidas pela adição de glicose (CBGI) e dextrina (CBDe) ao meio de cultura.

Tipo de ligação	Número de onda (cm ⁻¹)			Referência
	CBC	CBGI	CBDe	
v(O–H) celulose I _α	3346,4	3344,4	3346,2	(Yamamoto, Horii <i>et al.</i> , 1996)
Celulose I _α	3242,2	3242,2	3242,2	(Yamamoto, Horii <i>et al.</i> , 1996)
v _a (CH ₂)	2895,2	2897,2	2895,1	(Oh, Yoo <i>et al.</i> , 2005; Movasaghi, Rehman <i>et al.</i> , 2008)
C(O–H de absorção de água)	1641,4	1643,3	1643,1	(Oh, Yoo <i>et al.</i> , 2005)
δ(HCH, OCH), no plano	1427,1	1427,4	1427,3	(Oh, Yoo <i>et al.</i> , 2005)
CH, deformação angular	1360,1	1360,1	1360,3	(Oh, Yoo <i>et al.</i> , 2005)
v(CH ₂), no plano	1315,0	1315,2	1315,4	(Movasaghi, Rehman <i>et al.</i> , 2008)
v _a (C–O–C), deformação CH	1161,1	1161,0	1161,1	(Kacurakova, Smith <i>et al.</i> , 2002; Movasaghi, Rehman <i>et al.</i> , 2008)
v(C–C) (polissacarídeos, celulose)	1109,0	1109,4	1109,1	(Movasaghi, Rehman <i>et al.</i> , 2008)
δ(C–O) de C–OH de carboidrato	1059,3	1057,3	1057,0	(Movasaghi, Rehman <i>et al.</i> , 2008)
CH vibração fora do plano	897,2	897,3	896,4	(Kacurakova, Smith <i>et al.</i> , 2002)
δ(C–OH) fora do plano	667,3	665,3	665,0	(Oh, Yoo <i>et al.</i> , 2005)

v = estiramento; v_a = estiramento assimétrico; δ = ligação.

3.3.2 Avaliação da Adesão e Proliferação Celular

Na **Figura 19** é mostrada a análise do ensaio de MTS dos fibroblastos semeados nas membranas de CB. No primeiro dia de cultura o número de células viáveis foi maior do que o número de células semeadas (10⁵ células/poço). Não houve diferença significativa nas medições entre as membranas de CBC e CBDe, no entanto, uma maior proliferação celular pode ser observada na CBGI. O aumento do número de células viáveis na CBGI em comparação com a CBC e CBDe pode ser atribuído a maior porosidade e elevada micro-rugosidade do

lado superior da CB obtida na presença do meio enriquecido com glicose (**Figura 16d**).

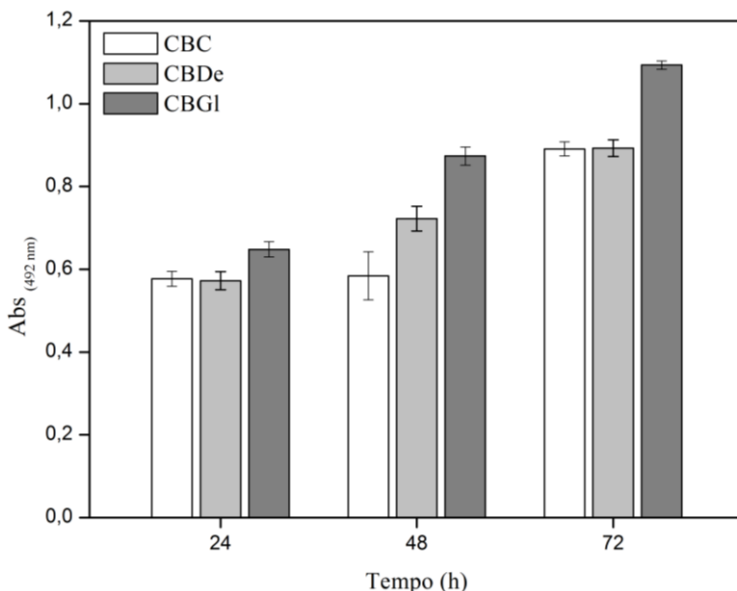


Figura 19 - A adesão/proliferação celular quantificada pelo ensaio de MTS como uma função do tempo. Propagação inicial foi de 10^5 células/poço. Barras de erro: desvio padrão entre três poços.

A **Figura 20** mostra as imagens de MEV (coluna da esquerda) e de fluorescência (coluna da direita) das células cultivadas sobre as membranas de CB. Nas imagens de MEV notam-se rachaduras nas membranas, provavelmente devido à técnica de secagem ao ponto crítico utilizada, a secagem foi realizada rapidamente o que deve ter proporcionado a ruptura das fibras de celulose. Como pode ser visto a modificação da microestrutura realizada com a adição de glicose no meio de cultura (CBGI) influenciou positivamente o comportamento das células de fibroblastos, aumentando a adesão e a proliferação celular quando comparado com a membrana controle (CBC) e a com meio enriquecido com dextrina (CBDe). Além disso, observou-se que a morfologia das células nas membranas de CBGI (**Figura 20c e d**), após 24 horas, é diferente quando comparado com as duas outras membranas. Os fibroblastos se apresentam de uma forma mais alongada do que a morfologia arredondada, o que indica uma melhor adesão celular e um

comportamento de fibroblastos saudáveis (Cho, Kobayashi *et al.*, 1996; Hsia, Nair *et al.*, 2011).

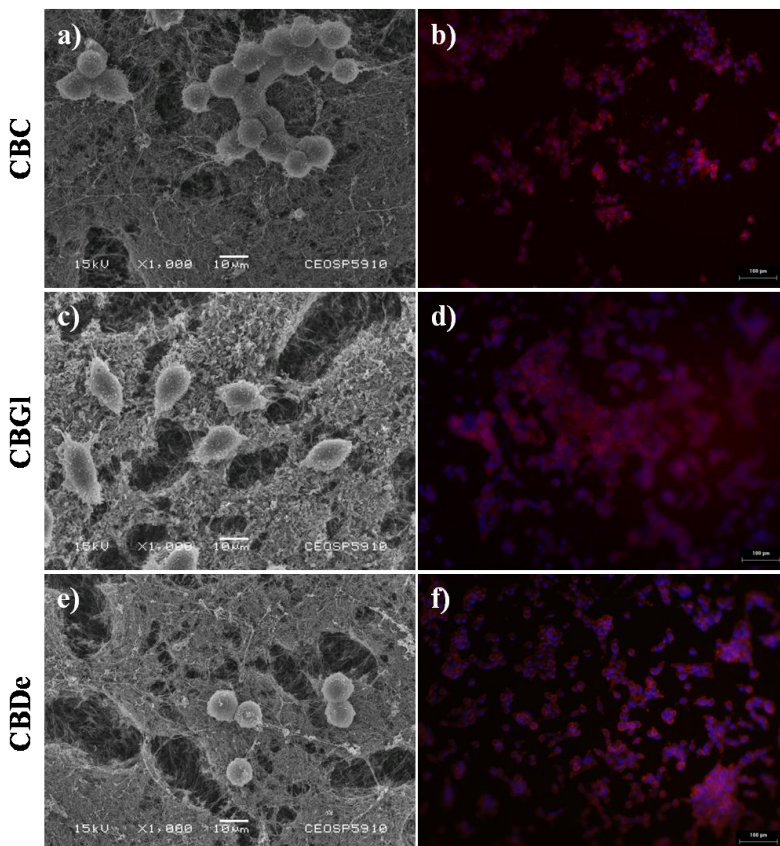


Figura 20 - Influência das microestruturas distintas sobre a morfologia dos fibroblastos semeados sobre as membranas de celulose bacteriana, após 24 h. a) CBC, c) CBGI e e) CBDe. Ampliação: 1000×. Imagens de fluorescência das células coradas: b) CBC, d) CBGI e f) CBDe. Ampliação: 100×. Núcleos das células foram corados com DAPI (azul) e o citoesqueleto de actina foi corado com rodamina-faloidina (vermelho).

As imagens de fluorescência (**Figura 20**) corroboram com os resultados obtidos pela análise de MTS. Ou seja, na membrana de CBGI a interação célula-CB parece ser maior do que nas outras membranas após 24 h de cultura. Este fato é evidenciado pelo citoesqueleto alongado. Nesta membrana, bem como nas outras, a matriz é composta por fibras orientadas aleatoriamente em escala nanométrica. No caso de

CBGI, a superfície resultante parece ser mais adequada para a fixação das células. Embora uma análise mais detalhada do comportamento das células a um nível molecular não tenha sido realizado, este estudo sugere que a introdução de uma maior porosidade e rugosidade no biomaterial melhora a adesão e proliferação de fibroblastos em CCBET.

3.4 CONSIDERAÇÕES PARCIAIS

Hidrogéis de celulose bacteriana com redes de fibras aleatórias (bio)construídos são construções de engenharia tecidual com promissoras aplicações biomédicas, especialmente construções de celulose bacteriana de engenharia tecidual (CCBTE), que detêm a capacidade de crescimento celular "saudável" e de sustentabilidade, o que os tornam adequados como implantes de tecidos ou outras aplicações terapêuticas. O manitol tem sido promovido como uma fonte de carbono principal, a fim de alcançar as construções de hidrogel consistentes, mas pouco foi dito sobre combinações de fontes de carbono, a fim de explorar as propriedades do microambiente que favorecem a adesão e proliferação celular.

Embora seja bem conhecido que o crescimento bacteriano é afetado pela composição do meio de cultura, para o caso da celulose bacteriana (CB), a membrana de hidrogel resultante e as propriedades podem ser afetadas pelas fontes de carbono ou nitrogênio utilizados para a biossíntese da CCBTE. Assim, a avaliação de meios de cultura enriquecidos foi abordada nesse sentido. A membrana de hidrogel de celulose, obtida por *Gluconacetobacter hansenii* é sintetizada por meio da introdução de unidades de glicose com as extremidades redutoras do polímero, resultando em nanofibras, o que se assemelha estruturalmente à componentes da matriz extracelular humana, tais como colágeno. A incorporação de compostos no meio de cultura de *G. hansenii*, incrementando assim a cultura e, muito provavelmente, aumentando o metabolismo de crescimento e de produção de celulose, o que pode alterar a construção da rede de fibra e a morfologia 2D (superfície) e 3D (porosidade) características da CB produzida. Glicose ou dextrina foram testadas como substratos não-tóxicos adicionais (meio enriquecido de manitol), a fim de promover agentes modificadores de superfície. A inclusão destes compostos fortuitamente resultaram em uma estrutura diferente de CB, embora, em princípio, sem modificação química. A CBGI apresentou uma maior porosidade e ambas as modificações diminuíram os valores da área de superfície, da CRA e da TR, em comparação com a CBC. A CBDe apresentou-se com uma maior estabilidade térmica quando comparada com a CBC e a CBGI. Através

das análises de MTS, MEV e fluorescência observou-se que as mudanças na microestrutura obtidas aqui foram capazes de melhorar a interação célula-material, conferindo assim características benéficas que podem ser úteis em dispositivos biomédicos e aplicações de engenharia tecidual. Avanços adicionais podem ser promovidos às membranas de CB utilizando fontes de carbono combinadas ou mais complexas para aumentar ainda mais a sua capacidade como CCBTE.

**CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÕES
PARA TRABALHOS FUTUROS**

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rede de fibras da celulose bacteriana (CB) pode gerar construções de engenharia tecidual com promissoras aplicações biomédicas, pois a CB detém a capacidade de crescimento celular, o que a torna adequada para implantes de tecidos ou outras aplicações terapêuticas. Conforme reportado no Capítulo 3, a fim de explorar as modificações nas características das membranas de CB e criar um microambiente que favorece a adesão e proliferação celular, glicose (CBGI) ou dextrina (CBDe) foram testadas como substratos não-tóxicos adicionais (meio enriquecido de manitol). A inclusão destes compostos fortuitamente resultou em uma estrutura diferente de CB, embora, em princípio, sem modificação química na natureza e superfície das fibras. A CBGI apresentou uma maior porosidade e ambas as modificações diminuíram os valores da área de superfície, da capacidade de retenção de água e taxa de reidratação, em comparação com a CBC (controle). As mudanças na microestrutura obtidas foram capazes de melhorar a interação célula-material, conferindo assim características benéficas que podem ser úteis em dispositivos biomédicos e aplicações de engenharia tecidual. Pesquisas adicionais podem ser feitas nas membranas de CB utilizando fontes de carbono combinadas ou mais complexas para aumentar ainda mais a sua capacidade como *scaffold* na engenharia de tecidos e órgãos.

No Capítulo 4, é descrito a produção de uma construção 3D multicompartimentalizada de celulose bacteriana, baseada na tecnologia CM^{3D} (BioCellTis/RegenTis). Essas construções baseada em uma plataforma proprietária (pedido de Patente), nunca foram relatadas na literatura. Quando se analisou o perfil de liberação do corante fucsina básica nesta construção, notou-se que ocorre a permeação, onde com 72 h de ensaio houve o máximo de liberação do corante. Pelo modelo computacional obteve-se um perfil de difusão, onde a concentração máxima foi de $0,17 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ em 76,4 h, o que representa 79,7 % de liberação, mostrando assim a diferença entre os perfis. Além disso, com o modelo foi possível estimar os coeficientes de difusão da fucsina básica em CB para a camada interna mais porosa e para a camada mais densa. E por meio do cultivo de fibroblastos na construção 3D foi mostrado o potencial desta como um atraente dispositivo para o desenvolvimento de inúmeras aplicações e ensaios de interesse biomédico, tais como liberação de fármacos, sinalização intercompartimentalizada, diferenciação celular programada e possibilidades de cultivo celular múltiplo, visando especificamente o seu uso em engenharia de tecidos.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o grau de cristalinidade, a degradação hidrolítica, a hidrofobicidade entre outras propriedades mecânicas das membranas de CB modificadas;
- Analisar a adesão, proliferação e migração de outras linhagens de células nas membranas de CB modificadas;
- Modificar as propriedades físico-químicas da plataforma CM^{3D}, com o intuito de ampliar a sua aplicabilidade;
- Alterar a permeabilidade de diversas moléculas orgânicas por meio das camadas da plataforma CM^{3D}. Modificações que podem ser realizadas com a formação de multicamadas com meios de cultura com glicose e dextrina, por exemplo.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, A. Cell culture: biology's new dimension. **Nature**, v. 424, p. 870-2, 2003.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667-681, 2000.

AUNG, B. J. **Does A New Cellulose Dressing Have Potential In Chronic Wounds?** Malvern. 17 2004.

BACKDAHL, H. *et al.* Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, p. 320-330, 2008.

BACKDAHL, H. *et al.* Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 2141-2149, 2006.

BACKDAHL, H.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Observations on bacterial cellulose tube formation for application as vascular graft. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 31, p. 14-21, 2011.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polimeros-Ciencia E Tecnologia**, v. 15, p. 13-21, 2005.

BARNES, C. P. *et al.* Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1413-1433, 2007.

BARREIRO, A. M. *et al.* Sand dollar skeleton as templates for bacterial cellulose coating and apatite precipitation. **Journal of Materials Science**, v. 45, p. 5252-5256, 2010.

BARUD, H. S. *et al.* Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 28, p. 515-518, 2008.

BARUD, H. S. *et al.* Transparent Bacterial Cellulose-Boehmite-epoxi-Siloxane Nanocomposites. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, 2012.

BARUD, H. S. *et al.* Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. **Thermochimica Acta**, v. 471, p. 61-69, 2008.

BARUD, H. S. *et al.* Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1279-1284, 2011.

BERTI, F. V. **Desenvolvimento de Estruturas Vasculares Endotelizadas em Scaffolds de Celulose Bacteriana**. 2012. 147 f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BODIN, A. *et al.* Modification of nanocellulose with a xyloglucan-RGD conjugate enhances adhesion and proliferation of endothelial cells: Implications for tissue engineering. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 3697-3704, 2007.

BODIN, A. *et al.* Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 425-434, 2007.

BODIN, A. *et al.* Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. **Biomaterials**, v. 31, p. 8889-8901, 2010.

BODIN, A. *et al.* Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, p. 406-408, 2007.

BORZANI, W. D. S., S. J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid-media. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1271-1272, 1995.

BOUDREAU, N.; BISSELL, M. J. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. **Curr Opin Cell Biol**, v. 10, p. 640-6, 1998.

BRACKMANN, C. *et al.* In situ Imaging of Collagen Synthesis by Osteoprogenitor Cells in Microporous Bacterial Cellulose Scaffolds. **Tissue Eng Part C Methods**, 2011.

BROWN, R. M. Bacterial cellulose: Its potential for new products of commerce. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 227, p. U303-U303, 2004.

BROWN, R. M.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 149-156, 1996.

BROWN, R. M.; WILLISON, J. H. M.; RICHARDSON, C. L. Cellulose Biosynthesis in *Acetobacter-Xylinum* - Visualization of Site of Synthesis and Direct Measurement of In vivo Process. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, p. 4565-4569, 1976.

BUYANOV, A. L. *et al.* Anisotropic swelling and mechanical behavior of composite bacterial cellulose-poly(acrylamide or acrylamide-sodium acrylate) hydrogels. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 3, p. 102-111, 2010.

CAI, Z. J.; YANG, G. Optical nanocomposites prepared by incorporating bacterial cellulose nanofibrils into poly(3-hydroxybutyrate). **Materials Letters**, v. 65, p. 182-184, 2011.

CARVALHO, J. *et al.* Production and characterization of a new dextrin based hydrogel. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 3050-3059, 2007.

CARVALHO, J. M.; COIMBRA, M. A.; GAMA, F. M. New dextrin-vinylacrylate hydrogel: Studies on protein diffusion and release. **Carbohydr Polym**, v. 75, p. 322-327, 2009.

CHANG, C. Y.; ZHANG, L. N. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 40-53, 2011.

CHANG, S. T. *et al.* Nano-biomaterials application: Morphology and physical properties of bacterial cellulose/gelatin composites via crosslinking. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 137-144, 2012.

- CHEN, S. Y. *et al.* Carboxymethylated-bacterial cellulose for copper and lead ion removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, p. 1355-1359, 2009.
- CHIDAMBARAM, N. *et al.* Formulation and characterization of new layered diffusional matrices for zero-order sustained release. **Journal of Controlled Release**, v. 52, p. 149-158, 1998.
- CHO, C. S. *et al.* Difference in adhesion and proliferation of fibroblast between Langmuir-Blodgett films and cast surfaces of poly(γ -benzyl L-glutamate)/poly(ethylene oxide) diblock copolymer. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 32, p. 425-432, 1996.
- CHOI, C. N. *et al.* Properties of bacterial cellulose produced in a pilot-scale spherical type bubble column bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 136-140, 2009.
- CHOI, J. S. *et al.* Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 139, p. 2-7, 2009.
- CIECHANSKA, D. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v. 12, p. 69-72, 2004.
- COLOMBO, P.; CARDONA, A. C.; PIFFERI, G. **Multilayer matrix systems for the controlled release of active principles**. Italy: Inverno Della Beffa S.p.A. 1996.
- CONTE, U. *et al.* Multi-layered hydrophilic matrices as constant release devices (GeomatrixTM Systems). **Journal of Controlled Release**, v. 26, p. 39-47, 1993.
- CUKIERMAN, E. *et al.* Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v. 294, p. 1708-12, 2001.
- CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Cell interactions with three-dimensional matrices. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, p. 633-9, 2002.

CUSHING, M. C.; ANSETH, K. S. Materials science. Hydrogel cell cultures. **Science**, v. 316, p. 1133-4, 2007.

CZAJA, W. *et al.* Microbial cellulose - the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 145-151, 2006.

CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. **Cellulose**, v. 11, p. 403-411, 2004.

CZAJA, W. K. *et al.* The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1-12, 2007.

DAHMAN, Y. Nanostructured Biomaterials and Biocomposites from Bacterial Cellulose Nanofibers. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, p. 5105-5122, 2009.

DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of Cell Science**, v. 121, p. 255-264, 2008.

DE SOUZA, F. C. *et al.* Bacterial Cellulose as Laryngeal Medialization Material: An Experimental Study. **Journal of Voice**, v. 25, p. 765-769, 2011.

DEBNATH, J.; BRUGGE, J. S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, p. 675-688, 2005.

DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process .3. Consecutively Alternating Adsorption of Anionic and Cationic Polyelectrolytes on Charged Surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210, p. 831-835, 1992.

DICKINSON, R. B.; CARO, L.; PURICH, D. L. Force generation by cytoskeletal filament end-tracking proteins. **Biophys J**, v. 87, p. 2838-54, 2004.

DIMILLA, P. A.; BARBEE, K.; LAUFFENBURGER, D. A. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. **Biophys J**, v. 60, p. 15-37, 1991.

- DOBEREINER, H. G. *et al.* Force sensing and generation in cell phases: analyses of complex functions. **J Appl Physiol**, v. 98, p. 1542-6, 2005.
- DOYLE, A. D. *et al.* One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. **J Cell Biol**, v. 184, p. 481-90, 2009.
- DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, p. 4337-4351, 2003.
- DUDMAN, W. F. Cellulose production by *Acetobacter actigenum* in defined medium. **J Gen Microbiol**, v. 21, p. 327-37, 1959.
- EL-SAIED, H.; BASTA, A. H.; GOBRAN, R. H. Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 43, p. 797-820, 2004.
- EL-SAIED, H. *et al.* Production and Characterization of Economical Bacterial Cellulose. **Bioresources**, v. 3, p. 1196-1217, 2008.
- ELSDALE, T.; BARD, J. Collagen Substrata for Studies on Cell Behavior. **Journal of Cell Biology**, v. 54, p. 626-&, 1972.
- EMBUSCADO, M. E.; MARKS, J. S.; BEMILLER, J. N. Bacterial Cellulose .1. Factors Affecting the Production of Cellulose by *Acetobacter-Xylinum*. **Food Hydrocolloids**, v. 8, p. 407-418, 1994.
- EVANS, B. R. *et al.* Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 18, p. 917-923, 2003.
- FALCAO, S. C.; EVENCIO NETO, J.; COELHO, A. R. Incorporation by host tissue of two biomaterials used as repair of defects produced in abdominal wall of rats. **Acta Cir Bras**, v. 23, p. 78-83, 2008.
- FAN, Y. *et al.* Spatial Coordination of Actin Polymerization and ILK-Akt2 Activity during Endothelial Cell Migration. **Developmental Cell**, v. 16, p. 661-674, 2009.

FEDER-MENGUS, C. *et al.* New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, p. 333-340, 2008.

FENG, Y. Y. *et al.* A mechanically strong, flexible and conductive film based on bacterial cellulose/graphene nanocomposite. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 644-649, 2012.

FERREIRA, M. C. *et al.* Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, p. 696-702, 2011.

FISCHBACH, C. *et al.* Engineering tumors with 3D scaffolds. **Nature Methods**, v. 4, p. 855-860, 2007.

FONTANA, J. D. *et al.* Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 24-25, p. 253-64, 1990.

FRIEDL, P.; BROCKER, E. B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, p. 41-64, 2000.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present Status and Applications of Bacterial Cellulose-based Materials for Skin Tissue Repair. **Carbohydrate Polymers**, 2013.

GAO, C. A. *et al.* Preparation and characterization of bacterial cellulose sponge with hierarchical pore structure as tissue engineering scaffold. **Journal of Porous Materials**, v. 18, p. 139-145, 2011.

GEA, S. *et al.* Bacterial cellulose-poly(vinyl alcohol) nanocomposites prepared by an in-situ process. **Materials Letters**, v. 64, p. 901-904, 2010.

GEORGE, J. *et al.* Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 50-57, 2011.

GRACHEVA, M. E.; OTHMER, H. G. A continuum model of motility in ameoid cells. **Bull Math Biol**, v. 66, p. 167-93, 2004.

GRANDE, C. J. *et al.* Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1605-1615, 2009.

GRIFFITH, L. G.; SWARTZ, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, p. 211-224, 2006.

GUHADOS, G.; WAN, W. K.; HUTTER, J. L. Measurement of the elastic modulus of single bacterial cellulose fibers using atomic force microscopy. **Langmuir**, v. 21, p. 6642-6646, 2005.

GUO, J.; CATCHMARK, J. M. Surface area and porosity of acid hydrolyzed cellulose nanowhiskers and cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 1026-1037, 2012.

HAKKINEN, K. M. *et al.* Direct comparisons of the morphology, migration, cell adhesions, and actin cytoskeleton of fibroblasts in four different three-dimensional extracellular matrices. **Tissue Eng Part A**, v. 17, p. 713-24, 2011.

HELENIUS, G. *et al.* In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 76A, p. 431-438, 2006.

HELMUS, M. N.; HUBBELL, J. A. Materials Selection. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, p. S53-S71, 1993.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v. 4, p. 518-524, 2005.

HSIA, H. C. *et al.* The fiber diameter of synthetic bioresorbable extracellular matrix influences human fibroblast morphology and fibronectin matrix assembly. **Plast Reconstr Surg**, v. 127, p. 2312-20, 2011.

HSIEH, Y. C. *et al.* An estimation of the Young's modulus of bacterial cellulose filaments. **Cellulose**, v. 15, p. 507-513, 2008.

HU, X. *et al.* The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, p. 8979-8989, 2011.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M. Formation and Characterization of Spherelike Bacterial Cellulose Particles Produced by *Acetobacter xylinum* JCM 9730 Strain. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 1727-1734, 2010.

HU, Y.; CATCHMARK, J. M. Integration of cellulases into bacterial cellulose: Toward bioabsorbable cellulose composites. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 97, p. 114-23, 2011.

HUANG, H. C. *et al.* Nano-biomaterials application In situ modification of bacterial cellulose structure by adding HPMC during fermentation. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 979-987, 2011.

HUANG, H. C. *et al.* In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6084-6091, 2010.

HUTCHENS, S. A. *et al.* Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 175-180, 2007.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts. **Journal of Materials Science**, v. 35, p. 261-270, 2000.

INGBER, D. E. Mechanical signalling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. **Circulation Research**, v. 91, p. 877-887, 2002.

ISHIDA, T. *et al.* Role of water-soluble polysaccharides in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, p. 474-478, 2003.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 17, p. 395-418, 2006.

- JAMAL, M. *et al.* Directed growth of fibroblasts into three dimensional micropatterned geometries via self-assembling scaffolds. **Biomaterials**, v. 31, p. 1683-1690, 2010.
- JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 101-106, 1998.
- JOSEPH, G. *et al.* Effects of polyacrylamide-co-acrylic acid on cellulose production by *Acetobacter xylinum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 964-970, 2003.
- JUNG, H. I. *et al.* Influence of glycerol on production and structural-physical properties of cellulose from *Acetobacter sp V6* cultured in shake flasks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3602-3608, 2010.
- JUNG, H. I. *et al.* Production and Characterization of Cellulose by *Acetobacter sp V6* Using a Cost-Effective Molasses-Corn Steep Liquor Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 486-497, 2010.
- KACURAKOVA, M. *et al.* Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1145-1153, 2002.
- KLEIN, C. E. *et al.* Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. **J Cell Biol**, v. 115, p. 1427-36, 1991.
- KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 378-386, 2005.
- KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, p. 3358-3393, 2005.
- KLEMM, D. *et al.* Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. **Polysaccharides II**, v. 205, p. 49-96, 2006.

KLEMM, D. *et al.* Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1561-1603, 2001.

KNIAZEVA, E.; PUTNAM, A. J. Endothelial cell traction and ECM density influence both capillary morphogenesis and maintenance in 3-D. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 297, p. C179-87, 2009.

KRYSTYNOWICZ, A. *et al.* Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 29, p. 189-195, 2002.

LANGER, R. Biomaterials: Status, challenges, and perspectives. **Aiche Journal**, v. 46, p. 1286-1289, 2000.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, p. 359-69, 1996.

LEE, J. W. *et al.* Direct incorporation of glucosamine and N-acetylglucosamine into exopolymers by *Gluconacetobacter xylinus* (=Acetobacter xylinum) ATCC 10245: Production of chitosan-cellulose and chitin-cellulose exopolymers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3970-3975, 2001.

LI, H. X. *et al.* Determination of the stoichiometry and critical oxygen tension in the production culture of bacterial cellulose using saccharified food wastes. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 2306-2311, 2011.

LIN, S. B. *et al.* Adding enzymatically modified gelatin to enhance the rehydration abilities and mechanical properties of bacterial cellulose. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 2195-2203, 2009.

LINA, F. *et al.* Bacterial Cellulose for Skin Repair Materials. In: FAZEL-REZAI, R. (Ed.). **Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges**. Croatia: Rijeka, 2011. p.249-274.

LIU, Y. *et al.* Optimization of a natural collagen scaffold to aid cell-matrix penetration for urologic tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 3865-3873, 2009.

LOKMIC, Z. *et al.* An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. **FASEB Journal**, v. 21, p. 511-522, 2007.

LUND, A. W. *et al.* The Natural and Engineered 3D Microenvironment as a Regulatory Cue During Stem Cell Fate Determination. **Tissue Engineering Part B-Reviews**, v. 15, p. 371-380, 2009.

LUTOLF, M. P. *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, p. 5413-8, 2003.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, p. 874-880, 2007.

MADURANTAKAM, P. A. *et al.* Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds. **Nanomedicine**, v. 4, p. 193-206, 2009.

MARZIEH MOOSAVI-NASAB, A. R. Y. **Investigation of Physicochemical Properties of the Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter xylinus* from Date Syrup.** World Academy of Science, Engineering and Technology: 1248-1253 p. 2010.

MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of Cellulose from Glucose by *Acetobacter-Xylinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 18-22, 1993.

MCKENNA, B. A. *et al.* Mechanical and structural properties of native and alkali-treated bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Cellulose**, v. 16, p. 1047-1055, 2009.

MEFTAHI, A. *et al.* The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. **Cellulose**, v. 17, p. 199-204, 2010.

MEHROTRA, S. *et al.* Time Controlled Protein Release from Layer-by-Layer Assembled Multilayer Functionalized Agarose Hydrogels. **Advanced Functional Materials**, v. 20, p. 247-258, 2010a.

MEHROTRA, S. *et al.* Time Controlled Protein Release from Layer by-Layer Assembled Multilayer Functionalized Agarose Hydrogels (vol

20, pg 247, 2010). **Advanced Functional Materials**, v. 20, p. 878-878, 2010b.

MELLO, L. R. *et al.* Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. **J Neurosurg**, v. 86, p. 143-50, 1997.

METHE, H.; HESS, S.; EDELMAN, E. R. The effect of three-dimensional matrix-embedding of endothelial cells on the humoral and cellular immune response. **Seminars in Immunology**, v. 20, p. 117-122, 2008.

MIKKELSEN, D. *et al.* Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 576-583, 2009.

MOGILNER, A.; EDELSTEIN-KESHET, L. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. **Biophys J**, v. 83, p. 1237-58, 2002.

MORONI, L. *et al.* Polymer hollow fiber three-dimensional matrices with controllable cavity and shell thickness. **Biomaterials**, v. 27, p. 5918-5926, 2006.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. U. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 134-179, 2008.

MULLER, D. *et al.* Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. **Synthetic Metals**, v. 161, p. 106-111, 2011.

NISHI, Y. *et al.* The Structure and Mechanical-Properties of Sheets Prepared from Bacterial Cellulose .2. Improvement of the Mechanical-Properties of Sheets and Their Applicability to Diaphragms of Electroacoustic Transducers. **Journal of Materials Science**, v. 25, p. 2997-3001, 1990.

NOVAES, A. B., JR.; NOVAES, A. B. Bone formation over a TiAl6V4 (IMZ) implant placed into an extraction socket in association with membrane therapy (Gengiflex). **Clin Oral Implants Res**, v. 4, p. 106-10, 1993.

OH, S. Y. *et al.* Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 2376-2391, 2005.

OLIVEIRA, V. A. **Produção e degradação in vitro de vasos sanguíneos artificiais à base de celulose bacteriana**. 2011. 65 f. (Master). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OSHIMA, T. *et al.* Phosphorylated bacterial cellulose for adsorption of proteins. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 953-958, 2011.

OWEN, S. C.; SHOICHET, M. S. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 94, p. 1321-31, 2010.

PALSSON, B.; BHATIA, S. **Tissue engineering**. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Prentice Hall, 2004. xviii, 407 p.

PEROTTI, G. F. *et al.* Bacterial cellulose-laponite clay nanocomposites. **Polymer**, v. 52, p. 157-163, 2011.

PÉRTILE, R. *et al.* Bacterial cellulose modified using recombinant proteins to improve neuronal and mesenchymal cell adhesion. **Biotechnology Progress**, v. 28, p. 526-532, 2012.

PÉRTILE, R. A. N. *et al.* Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 23, p. 1339-1354, 2012.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1277-1286, 2011.

PHISALAPHONG, M.; SUWANMAJO, T.; SANGTHERAPITIKU, P. Novel nanoporous membranes from regenerated bacterial cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 107, p. 292-299, 2008.

QIU, Y. H.; CHIDAMBARAM, N.; FLOOD, K. Design and evaluation of layered diffusional matrices for zero-order sustained-release. **Journal of Controlled Release**, v. 51, p. 123-130, 1998.

RAEBER, G. P.; LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. A. Molecularly engineered PEG hydrogels: a novel model system for proteolytically mediated cell migration. **Biophys J**, v. 89, p. 1374-88, 2005.

RAMANA, K. V.; TOMAR, A.; SINGH, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 245-248, 2000.

RATNER, B. D. **Biomaterials science : an introduction to materials in medicine**. 2nd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004. xii, 851 p.

RAVANTI, L. *et al.* Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 2446-2455, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. Rio de Janeiro: 2010. 830.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de novos biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações biomédicas e de engenharia de tecidos**. 2008. 124 f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RECOUVREUX, D. O. S. *et al.* Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 31, p. 151-157, 2011.

RIDLEY, A. J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. **Science**, v. 302, p. 1704-9, 2003.

RUBINSTEIN, B.; JACOBSON, K.; MOGILNER, A. Multiscale Two-Dimensional Modeling of a Motile Simple-Shaped Cell. **Multiscale Model Simul**, v. 3, p. 413-439, 2005.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. In situ Modifications to Bacterial Cellulose with the Water Insoluble Polymer Poly-3-hydroxybutyrate. **Carbohydrate Polymers**.

RUKA, D. R.; SIMON, G. P.; DEAN, K. M. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 613-622, 2012.

SAIBUATONG, O. A.; PHISALAPHONG, M. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 455-460, 2010.

SAKAGUCHI, M.; OHURA, T.; IWATA, T. Diblock copolymer of bacterial cellulose and poly(methyl methacrylate) initiated by chain-end-type radicals produced by mechanical scission of glycosidic linkages of bacterial cellulose. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 241, 2011.

SANCHAVANAKIT, N. *et al.* Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1194-1199, 2006.

SASKA, S. *et al.* Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. **Int J Biomater**, v. 2011, p. 175362, 2011.

SCHMEICHEL, K. L.; BISSELL, M. J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 2377-2388, 2003.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Factors Affecting Production of Cellulose at the Air Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter-Xylinum*. **Journal of General Microbiology**, v. 11, p. 123-&, 1954.

SCHUMANN, D. A. *et al.* Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes. **Cellulose**, v. 16, p. 877-885, 2009.

SERSHEN, S.; WEST, J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 1225-1235, 2002.

SERVICE, R. F. Tissue engineering - Technique uses body as 'bioreactor' to grow new bone. **Science**, v. 309, p. 683-683, 2005.

SHAH, J.; BROWN, R. M. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, p. 352-355, 2005.

SHEZAD, O. *et al.* Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 1689-1692, 2009.

SHEZAD, O. *et al.* Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 173-180, 2010.

SHOICHET, M. S. Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. **Macromolecules**, v. 43, p. 581-591, 2010.

SHORES, J. T.; GABRIEL, A.; GUPTA, S. Skin substitutes and alternatives: a review. **Adv Skin Wound Care**, v. 20, p. 493-508; quiz 509-10, 2007.

SHREIBER, D. I.; BAROCAS, V. H.; TRANQUILLO, R. T. Temporal variations in cell migration and traction during fibroblast-mediated gel compaction. **Biophys J**, v. 84, p. 4102-14, 2003.

SIRO, I.; PLACKETT, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, v. 17, p. 459-494, 2010.

SOKOLNICKI, A. M. *et al.* Permeability of bacterial cellulose membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 272, p. 15-27, 2006.

SPRUIT, D.; MALTEN, K. E. Regeneration Rate of Water Vapour Loss of Heavily Damaged Skin. **Dermatologica**, v. 132, p. 115-&, 1966.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: Current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 443-451, 2001.

STREUBEL, A. *et al.* Bimodal drug release achieved with multi-layer matrix tablets: transport mechanisms and device design. **Journal of Controlled Release**, v. 69, p. 455-468, 2000.

- SUN, T. *et al.* Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 372-381, 2006.
- SVENSSON, A. *et al.* Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, p. 419-431, 2005.
- TANG, W. H. *et al.* The influence of fermentation conditions and post-treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 125-131, 2010.
- TANG, Z. Y. *et al.* Biomedical applications of layer-by-layer assembly: From biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, v. 18, p. 3203-3224, 2006.
- TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, p. 655-663, 2009.
- TROVATTI, E. *et al.* Novel bacterial cellulose-acrylic resin nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 70, p. 1148-1153, 2010.
- UL-ISLAM, M.; KHAN, T.; PARK, J. K. Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 596-603, 2012.
- UL-ISLAM, M. *et al.* Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 1736-1743, 2011.
- VANDAMME, E. J. *et al.* Improved production of bacterial cellulose and its application potential. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 93-99, 1998.
- WAKATSUKI, T. *et al.* Cell mechanics studied by a reconstituted model tissue. **Biophys J**, v. 79, p. 2353-68, 2000.
- WAN, W. K. *et al.* Bacterial cellulose and its nanocomposites for biomedical applications. **Cellulose Nanocomposites: Processing, Characterization, and Properties**, v. 938, p. 221-241, 2006.

WANG, J. H. *et al.* Preparation and in vitro characterization of BC/PVA hydrogel composite for its potential use as artificial cornea biomaterial. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 30, p. 214-218, 2010.

WATANABE, K. *et al.* Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. **Cellulose**, v. 5, p. 187-200, 1998.

WATANABE, K.; YAMANAKA, S. Effects of Oxygen-Tension in the Gaseous-Phase on Production and Physical-Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 65-68, 1995.

WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials**. Liverpool: Liverpool University Press, 1999. xvii, 343 p.

WIPPERMANN, J. *et al.* Preliminary Results of Small Arterial Substitute Performed with a New Cylindrical Biomaterial Composed of Bacterial Cellulose. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 37, p. 592-596, 2009.

WOEHL, M. A. *et al.* Bionanocomposites of thermoplastic starch reinforced with bacterial cellulose nanofibres: Effect of enzymatic treatment on mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 866-873, 2010.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell**, v. 130, p. 601-610, 2007.

YAMAMOTO, H.; HORII, F.; HIRAI, A. In situ crystallization of bacterial cellulose .2. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I-alpha and I-beta at the early stage of incubation. **Cellulose**, v. 3, p. 229-242, 1996.

YAMANAKA, S. *et al.* Production, property, and application of bacterial cellulose. **Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry**, v. 72, p. 1039-1044, 1998.

YAMANAKA, S. C. C. O. R. J., ONO EIJU C O CENTRAL RESEARCH (JP), WATANABE, KUNIHICO CENTRAL C. O. (JP),

KUSAKABE, MASAHIRO SONY COR C. O. (JP), SUZUKI, YOSHIAKI SONY CORPO C. O. (JP). **Hollow microbial cellulose, process for preparation thereof, and artificial blood vessel formed of said cellulose.**: AJNOMOTO KK (JP),SONY CORP (JP) 1990.

YANG, S. F. *et al.* The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part 1. Traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 679-689, 2001.

YOSHINAGA, F.; TONOUCI, N.; WATANABE, K. Research progress in production of bacterial cellulose by aeration and agitation culture and its application as a new industrial material. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 219-224, 1997.

ZABOROWSKA, M. *et al.* Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2540-2547, 2010.

ZAHEDMANESH, H. *et al.* Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v. 97B, p. 105-113, 2011.

ZAMAN, M. H. *et al.* Computational model for cell migration in three-dimensional matrices. **Biophys J**, v. 89, p. 1389-97, 2005.

ZHU, H. X. *et al.* Preparation and Application of Bacterial Cellulose Sphere: A Novel Biomaterial. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, p. 2233-2236, 2011.