



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

**Produção e Degradação *in vitro* de Vasos Sanguíneos
Artificiais à Base de Celulose Bacteriana**

VANESSA ALMEIDA DE OLIVEIRA

FLORIANÓPOLIS

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Vanessa Almeida de Oliveira

**Produção e Degradação *in vitro* de Vasos Sanguíneos
Artificiais à Base de Celulose Bacteriana**

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.

Orientador: Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Renato Rambo

**FLORIANÓPOLIS
2011**

Oliveira, Vanessa Almeida

Produção e degradação *in vitro* de vasos sanguíneos artificiais
à base de celulose bacteriana.

Vanessa Almeida de Oliveira, Florianópolis – 63p.2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-graduação em Engenharia Química na área de Processos Químicos e
Biotecnológicos.

Título em inglês: Production and *in vitro* degradation of bacterial cellulose
artificial blood vessels.

PRODUÇÃO E DEGRADAÇÃO *in vitro* DE VASOS
SANGUÍNEOS ARTIFICIAIS À BASE DE CELULOSE BACTERIANA

Por

Vanessa Almeida de Oliveira

Dissertação julgada para a obtenção do Título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração de **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Orientador

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo
Coorientador

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luismar Marques Porto
Presidente

Prof. Dra. Cíntia Soares
Membro Interno

Prof. Dra. Ana Paula Testa Pezzin
Membro Externo

Dra. Renata Aparecida Nedel Pértile
Membro Externo Participante

Dedico esse trabalho a quem tem sede
de conhecimento.

Agradecimentos

Agradeço a tudo e a todas as pessoas que possam ter contribuído para que esse mestrado corresse bem.

Agradeço a Deus por minha presença neste mundo e por sempre me proporcionar companhias e momentos inesquecíveis.

Agradeço aos meus pais, Osmar e Sueli pelo amor sem medidas e sem limites de espaço geográfico, pelo apoio nas minhas lutas do cotidiano em busca do meu lugar ao sol e, principalmente, por sempre priorizar minha educação e estudos. Se não fossem vocês eu não estaria aqui hoje.

Agradeço à minha irmã Andressa que compartilhou comigo esses dois anos de mestrado, aguentando meus altos e baixos e, principalmente, por me emprestar seu notebook no momento em que o meu estragou e eu mais precisei: a finalização do trabalho.

Agradeço ao meu orientador, o professor Luismar, por um dia ter acreditado em meu potencial e ter me chamado para trabalhar em seu laboratório. Agradeço à paciência e às horas dedicadas aos meus questionamentos sobre o trabalho. Muito obrigada.

Agradeço, e muito, ao meu co-orientador, o professor Rambo, pois sem seu suporte científico, sua dedicação e sua paciência sem medidas com meus milhões de questionamentos eu não teria tido um desenvolvimento de trabalho tão satisfatório. Obrigada por me apoiar nos momentos de “cegueira”.

Quero agradecer também ao professor Leonel que foi quem me trouxe à engenharia dos cálculos, simulações matemáticas e termodinâmica! Pela paciência em me explicar como pensa um engenheiro e por tentar me ensinar cálculo com papel e tesoura (risos). Foi a abertura das portas para uma nova maneira de ver o mundo. Meu sincero e humilde agradecimento.

Agradeço a todos os meus colegas desse um ano de Intelab e especialmente às pessoas que conviveram mais comigo.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro sem o qual eu não teria realizado este trabalho.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
não é motivo para não querê-las...”

(Mário Quintana)

Resumo

O alto índice de mortes por doenças coronarianas leva a engenharia de tecidos a voltar-se para o desenvolvimento de métodos paliativos a essas patologias como, por exemplo, a construção de vasos sanguíneos artificiais. Esses vasos precisam atender aos requisitos do organismo assim como ter como base um material biocompatível. Nessa linha alguns grupos de pesquisa já desenvolveram vasos artificiais à base de celulose bacteriana (CB), um biopolímero que tem sido largamente estudado para aplicações biomédicas como na construção de matrizes 3D para suporte ao crescimento celular. Esses vasos já estão caracterizados, porém nada se estudou sobre a degradação destes no organismo vivo. Para tanto nesse trabalho foi desenvolvido um aparato para a produção de 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. Segmentos de vasos de CB foram imersos em PBS e salina a 37,8°C seguindo um protocolo de 20 semanas com retiradas mensais para análises estruturais em microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos vasos pós-ensaio e verificação de glicose nos líquidos de imersão por espectrofotometria no UV-VIS. 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.

Palavras-chave: celulose bacteriana, degradação *in vitro*, vasos artificiais.

Abstract

The high death rate from coronary heart disease leads to tissue engineering to turn the development of palliative methods to these pathologies such as the construction of artificial blood vessels. These vessels have to fulfill the requirements of the body and be based on a biocompatible material. In this line some research groups have developed artificial blood vessels based on bacterial cellulose (BC), a biopolymer that has been widely studied for biomedical applications as the construction of 3D matrices to support cell growth. These vessels are characterized however nothing has been studied on the degradation of these in the living organism. To this end in this work was developed an apparatus for the production of artificial vessels based on BC, as well as production, characterization and *in vitro* degradability of these vessels in fluids that simulated physiological conditions. BC vessel segments were immersed in PBS and saline at 37.8 ° C following a protocol of 20 weeks with monthly withdrawals for structural analysis in scanning electron microscopy in the vessels after testing and evaluating of glucose in the liquid immersion by spectrophotometry on UV-VIS. As results there were no apparent structural changes and characteristics of polymeric degradation in SEM analysis, neither the presence of glucose in the liquids of immersion. The results characterized that there was no degradation in the samples during the 20 weeks.

Keywords: bacterial cellulose, *in vitro* degradation, artificial blood vessels.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AVE	Acidente vascular encefálico
CB	Celulose bacteriana
3D	Tridimensional
ATCC 23769	Linhagem da bactéria <i>Gluconacetobacter hansenii</i>
AGU	Anidroglicose
GP	Grau de polimerização
BASIC®	Vaso sanguíneo artificial comercial
C14	Carbono 14
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Solução salina tamponada com fosfato)
FEG-SEM	Microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo
UV	Ultravioleta
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
UV-VIS	Ultravioleta-visível
INTELAB	Laboratório de tecnologias integradas
EQA	Departamento de Engenharia Química e de Alimentos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
CCT	Coleção de culturas tropicais
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LABMASSA	Laboratório de Transferência de Massa

Lista de Figuras

Figura 1 - Artérias e veias: composição tecidual. Fonte: FINK, 2009..	26
Figura 2 - Microtubos para implante em carótida de ratos (a) e suínos (b). Fonte: SCHUMANN et al., 2009.	29
Figura 3 - Estrutura Química da Celulose. Fonte: VIEIRA, 2004 apud OLIVEIRA (2009).	32
Figura 4 - Fermentação com injeção de O ₂ . Fonte: BODIN et al., 2007.	34
Figura 5 - Biorreator para produção de vasos de CB. Fonte: FINK, 2009.	35
Figura 6 - Fluxograma geral da metodologia utilizada.	39
Figura 7 - Aparato para produção de vasos de CB.....	40
Figura 8 - Protocolo de degradação dos vasos de CB.....	42
Figura 9– Vasos de celulose bacteriana: a) aparato; b) vaso.....	46
Figura 10– Vasos após secagem: a) estufa a 50°C por 24 horas; b) liofilizado.	47
Figura 11– Micrografias de MEV de um vaso liofilizado: a) superfície interna, b) superfície externa.	49
Figura 12– Micrografias obtidas por MEV dos vasos de CB tratados com NaOH em diferentes concentrações: a) 0,1 M e b) 0,5 M.....	50

Figura 13– Concentração de glicose nas amostras durante os ensaios de degradação dos vasos de CB: a) vasos tratados com NaOH 0,1 M (desvio padrão de 0 para PBS e 0,84515 para Salina); b) vasos tratados com NaOH 0,5 M (desvio padrão de 0 para PBS e 0,11957 para Salina)..... 52

Figura 14– Micrografias de MEV dos vasos submetidos ao ensaio de degradação: tratados com NaOH 0,1 M e imersos em PBS (a e b) e Salina (c e d); tratados com NaOH 0,5 M e imersos em PBS (e e f) e Salina (g e h). Micrografias da coluna esquerda são da parede interna dos vasos e da coluna direita são da parede externa..... 54

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Desenvolvimento em Engenharia de Tecidos. Aplicações em Cardiologia.....	25
2.2 Importância da escolha dos biomateriais pré-implante.....	29
2.2.1 A Celulose bacteriana e suas aplicações na medicina.....	30
2.3 Desenvolvimento de vasos a partir de celulose bacteriana.....	34
2.4 A vida útil do biomaterial no organismo vivo: degradação.....	36
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivos gerais.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 METODOLOGIA.....	39
4.1 Obtenção dos vasos artificiais: obtenção, tratamento e caracterização.....	39
4.2 Estudos da degradação da celulose bacteriana.....	41
4.2.1 Segmentos de Vasos de Celulose Bacteriana.....	41
4.2.2 Espectrofotometria de UV-VIS.....	42
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura dos Vasos.....	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 Obtenção e caracterização dos vasos.....	45
5.1.1 Mercerização.....	49
5.1.2 Ensaios de degradação dos vasos de celulose bacteriana.....	51
6 CONCLUSÕES.....	57
7 SUGESTÕES.....	59
8 REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, as doenças de cunho cardíaco estão entre as maiores causas de mortes por ano. Patologias como aterosclerose, aneurisma e varizes levam milhares de pacientes a fazer procedimentos de substituição de vasos sanguíneos injuriados. Essa intervenção é necessária para a manutenção da vida através do reestabelecimento do fluxo sanguíneo ininterrupto, responsável pelo transporte e distribuição de fatores essenciais ao metabolismo tecidual. Devido a esses altos índices de mortalidade por doenças cardíacas, diversos estudos em Engenharia de Tecidos visam o desenvolvimento de vasos artificiais para a substituição de vasos sanguíneos injuriados. Este tipo de procedimento evitaria a necessidade de se retirar segmentos de vasos de outras áreas do corpo do paciente como ocorre na cirurgia de revascularização miocárdica por ponte de safena aorto-coronária, no qual parte da veia safena da perna é retirada para fazer o desvio, “*bypass*”, de sangue da aorta às artérias coronárias com problemas de fluxo, restabelecendo assim a irrigação sanguínea nesse local (MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011; BODIN *et al.*, 2007; SCHUMANN *et al.*, 2009).

A celulose de origem bacteriana tem se mostrado um produto de grande potencial para o desenvolvimento de biomateriais para uso na medicina. Esse fato se deve a várias propriedades do material, como biodegradabilidade, biocompatibilidade, entre outros (CHEN *et al.*, 2009; KLEMM *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WIPPERMANN *et al.*, 2009). Alguns pesquisadores utilizaram a celulose bacteriana como biomaterial base na construção de vasos sanguíneos artificiais (KLEMM *et al.*, 2001; WIPPERMANN *et al.*, 2009; BODIN *et al.*, 2007; FINK, 2009). Entretanto, qualquer biomaterial a ser implantado para testes *in vivo* deve ter sua origem e composição conhecidas para se evitar danos ao organismo. Para esse fim são realizados estudos do biomaterial, como os de caracterização físico-química e biocompatibilidade *in vitro* e com tecidos vivos. (PEREIRA *et al.*, 1999).

É importante que, além da caracterização de um biomaterial com potencial para implante, sejam também conhecidos seu tempo de degradação, os produtos da degradação e os efeitos desses, tóxicos ou não, no organismo (CHEN *et al.*, 2009).

A produção, caracterização e degradação *in vitro* de vasos sanguíneos artificiais a partir de celulose é o objeto de estudo deste trabalho. Como principais inovações deste trabalho foi desenvolvido um

método de fácil reprodução de vasos sanguíneos artificiais à base de celulose e realizado ensaios de degradação de 20 semanas em meios que simulam os fisiológicos para estudar e simular o tempo de vida útil desses vasos no organismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desenvolvimento em Engenharia de Tecidos. Aplicações em Cardiologia

O coração é um órgão muscular do tamanho de um punho fechado e funciona como uma bomba propulsora de sangue, fluido que carrega oxigênio e nutrientes essenciais às células de todo o corpo. Essa bomba está aliada a um conjunto de vasos sanguíneos que proporcionam a distribuição desse fluido a todas as partes do organismo, inclusive ao próprio músculo cardíaco (miocárdio) através das artérias coronárias. Os vasos sanguíneos estão divididos em artérias, que levam o sangue do coração aos tecidos, e as veias que recolhem o sangue dos tecidos e o trazem de volta ao coração. Essas veias e artérias se ramificam até formarem vênulas e capilares de diâmetros milimétricos (GOSS, 1988; MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011). Na Figura 1 Fink (2009) mostra o esquema da composição tecidual de veias e artérias sadias onde se observa várias lâminas de diferentes tipos celulares: a íntima formada por células endoteliais, a túnica média formada por células musculares lisas e a adventícia composta por tecido conjuntivo.

Os batimentos cardíacos de uma pessoa em repouso seguem a contagem de 70 batidas por minuto e o ritmo pode acelerar de acordo com as emoções e as atividades da pessoa. Um bom suprimento de sangue é vital para o funcionamento normal de todos os órgãos e quando esse fluxo é interrompido ocorre isquemia tecidual e consequente infarto da área em questão. Esses problemas acontecem devido a danos vasculares como rompimentos de vasos por aneurismas (estreitamento da parede vascular) ou fluxo sanguíneo em baixa devido ao estreitamento do lúmen do vaso (espaço interno do vaso) causado pela aterosclerose, em que ocorre a deposição de placas de gordura e cicatrização com formação de fibrose nas paredes internas dos vasos (GOSS, 1988; MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011).

dieta não saudável, sedentarismo e alcoolismo. Esses fatores alteram o metabolismo provocando o aumento da pressão sanguínea (hipertensão), o aumento da concentração de glicose no sangue, o sobrepeso e obesidade e o aumento do índice de lipídeos no sangue (dislipidemia). De modo geral os fatores de risco causam danos aos vasos coronarianos e cerebrais devido à aterosclerose. A aterosclerose é um processo que se desenvolve ao longo dos anos, iniciando na infância e se manifestando na meia idade através de infartos do miocárdio e acidentes vasculares encefálicos (MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011).

Em pessoas com alto grau de risco de doenças cardiovasculares algumas intervenções medicamentosas diminuem o risco de morte. Dentre elas faz-se o uso de aspirinas, estatinas, beta bloqueadores, terapias para diminuição dos lipídeos circulantes e agentes redutores da pressão arterial. Em estágios mais avançados da doença ou complicações a intervenção realizada é a cirúrgica. Como métodos cirúrgicos mais difundidos apresentam-se a angioplastia para a colocação de *stents* nos vasos com lúmen estreitados devido à aterosclerose e os procedimentos de *bypass* como a ponte de safena, onde um segmento da veia safena da perna é colocado no lugar de uma coronária injuriada a fim de fazer uma ponte para restabelecimento do aporte sanguíneo da região em questão. Procedimentos de *bypass* são utilizados quando a maior parte das artérias coronarianas está comprometida, fato esse que pode ocasionar a falência do coração por falta de fornecimento sanguíneo (MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011; SCHUMANN *et al.*, 2009).

Além das pesquisas científicas e campanhas governamentais para a prevenção através da diminuição dos fatores de risco, uma outra linha de frente visa o tratamento e "reparo" dos indivíduos já acometidos pelas doenças cardiovasculares. Essa linha busca o desenvolvimento de novos métodos menos invasivos e mais eficazes que os amplamente conhecidos e difundidos mundialmente como a angioplastia, pontes de safena, reparos de válvula cardíaca e a substituição destas por válvulas de animais, transplantes de coração, entre outros (MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011; BODIN *et al.*, 2007).

Recentemente os avanços nas pesquisas biomédicas e na engenharia de tecidos (ou engenharia tecidual) levaram a medicina para outro patamar onde se torna cada vez mais palpável o desenvolvimento de órgãos artificiais. Pesquisas com células-tronco e implantes de novos biomateriais que ajudem na regeneração tecidual são os maiores enfoques. Nas pesquisas que envolvem a cardiologia já se podem

observar modelos de estruturas do sistema cardiovascular, como miocárdio e válvulas, sendo desenvolvidos em laboratório com ótimos prognósticos de sucesso (BURSAC *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2003; KOFIDIS *et al.*, 2002a e 2002b; PAPADAKI *et al.*, 2001; SALES *et al.*, 2005; SCHUMANN *et al.*, 2009; ZIMMERMANN *et al.*, 2002).

Na engenharia de tecidos três fatores são de extrema importância: as células a serem utilizadas, os *scaffolds* 3D e os fatores de crescimento celular. Como parte do processo de engenharia de tecidos fixam-se as células em um *scaffold* que agirá como suporte (matriz) e provedor de nutrientes, citocinas e fatores de crescimento. Para tanto essa matriz deve ser biocompatível, porosa e proporcionar atividade de superfície, força mecânica e degradação programada (CHEN *et al.*, 2009).

A ideia da utilização de matrizes poliméricas (*scaffolds*) como suporte para crescimento celular e regeneração tecidual tem levado a engenharia de tecidos na busca de materiais biocompatíveis que possam ser implantados no organismo para esse fim. Em especial na cardiologia, ensaios com produção de matrizes poliméricas como *stents* ou vasos sanguíneos artificiais tem mostrado bons resultados clínicos nas cobaias e, portanto, apresentam um grande potencial para utilização como substituintes de vasos sanguíneos comprometidos, evitando-se assim a retirada de vasos saudáveis do próprio paciente como é feito na cirurgia de ponte de safena (SCHUMANN *et al.*, 2009). A pesquisa com esses vasos tende a ser menos custosa do que as pesquisas com células e órgãos artificiais. Isso ocorre devido ao fato dos *scaffolds* serem sistemas menos complexos do ponto de vista estrutural e funcional do que um órgão e a obtenção de resultados e consequente implantação tendem a ser mais rápidos, pois, logo após a produção, a caracterização e os ensaios de biocompatibilidade *in vitro*, esses sistemas seguem rapidamente para a etapa *in vivo* (SCHUMANN *et al.*, 2009). Essa ideia pode ser visualizada nos ensaios *in vivo* já realizados por pesquisadores como Schumann e colaboradores (2009) que produziram vasos artificiais e implantaram em artérias carótidas de ratos e suínos (Figura 2).

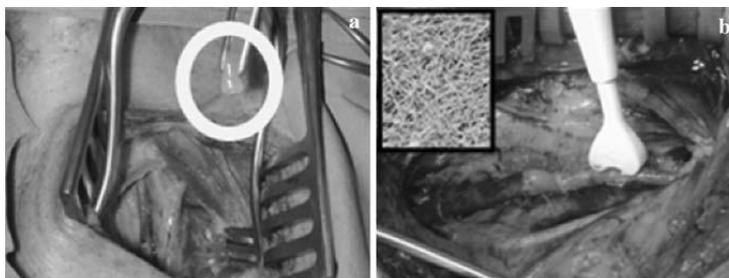


Figura 2 - Microtubos para implante em carótida de ratos (a) e suínos (b).
Fonte: SCHUMANN et al., 2009.

Para a produção de vasos é necessária a escolha de um biomaterial que atenda a todos os requisitos primordiais para exercer a função e que seja plausível de implantação *in vivo*.

2.2 Importância da escolha dos biomateriais pré- implante

Para a escolha de um biomaterial faz-se necessário a análise de vários quesitos como, por exemplo, o efeito que ele sofre no ambiente orgânico (corrosão, degradação) e o efeito desse biomaterial no organismo. Um dos pontos cruciais é a interação dos tecidos vivos em resposta à presença do material. Essa interação depende da composição do material e pode ser de vários tipos: tóxica, não-tóxica (bioinerte), bioativa e biodegradável. Estas interações são importantes tanto para a substituição dos tecidos lesados quanto para a recuperação desses tecidos através da atuação em seu metabolismo (intra ou extracelular) propagando o crescimento e a renovação celular (PEREIRA *et al.*, 1999).

Para implantes *in vivo* o biomaterial deve ser totalmente degradável, não permanecendo tempo desnecessário no organismo (WIPPERMANN *et al.*, 2009). Para tanto é de extrema importância conhecer seu tempo de degradação e avaliar se este é inferior, ideal ou superior ao proposto para a sua função (CHEN *et al.*, 2009). Em regeneração tecidual não é interessante que a matriz se degrade em tempo inferior ao da formação do novo tecido, e sim que seja substituída gradativamente. Isso é desejado no implante dos vasos artificiais onde uma degradação rápida do biomaterial, antes do restabelecimento do novo vaso, comprometeria o fluxo sanguíneo e promoveria o extravasamento de células para o meio externo aos vasos, com possíveis complicações

patológicas. Segundo a literatura, o maior problema está em sincronizar a degradação do biomaterial com o crescimento das células a fim de se criar o material com degradação programada (WIPPERMANN *et al.*, 2009).

Um dos biomateriais de grande foco biomédico nos dias atuais é biopolímero de celulose bacteriana.

2.2.1 A Celulose bacteriana e suas aplicações na medicina

A celulose bacteriana (CB) consiste em uma cadeia molecular de glicose formada por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) (BODIN *et al.*, 2007). Como polímero natural, ela tem aplicabilidade em membranas auditivas, papel eletrônico, pele artificial e é um dos novos materiais utilizados para a construção de matrizes poliméricas 3D (*scaffolds*) (BODIN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009). Essas aplicabilidades se devem à sua cristalinidade, quiralidade, resistência mecânica, porosidade, biocompatibilidade, atoxicidade, biodegradabilidade e ótima rede estrutural. Por essas propriedades, a CB está sendo utilizada em pesquisas de regeneração de cartilagens, vasos artificiais e em engenharia de tecidos óssea (BODIN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009; KLEMM *et al.*, 2005).

A CB é insolúvel em água e em solventes orgânicos convencionais e para aumentar sua degradabilidade e interação com outras moléculas ela é processada quimicamente com o intuito de afrouxar suas cadeias (AOUADA *et al.*, 2009).

2.2.1.1 Características da Celulose Bacteriana

Vários gêneros de bactérias produzem celulose tais como *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Sarcina* e *Acetobacter*. Um dos mais estudados é o *Acetobacter*, reclassificado como *Gluconacetobacter*, um bastonete Gram-negativo e excelente produtor de celulose (BODIN *et al.*, 2007; MOOSAVI-NASAB e YOUSEFI, 2010; SCHUMANN *et al.*, 2009). A linhagem ATCC 23769 da *Gluconacetobacter hansenii* tem sido largamente utilizada por pesquisadores do grupo Intelab como Rambo *et al.* (2008) e Recouvreux *et al.* (2011) na utilização em nanocompósitos para diversas finalidades biomédicas.

A *G.hansenii* utiliza a glicose como fonte de carbono para seu metabolismo celular e tem a capacidade de produzir celulose sob a forma de películas na interface ar/líquido em meio de cultura estático ou agitado (SCHUMANN *et al.*, 2009). A celulose de origem bacteriana e a de origem vegetal não se diferenciam no aspecto químico; entretanto, a celulose de origem vegetal normalmente está associada a outras macromoléculas como a hemicelulose e a lignina; portanto, necessita ser purificada através de tratamento químico, enquanto que a celulose de origem bacteriana é livre de macromoléculas e apresenta um grau de pureza próximo a 100% (BODIN *et al.*, 2007). Esse alto grau de pureza é um dos principais fatores que a torna um material biocompatível, assim como o fato de seus poros e sua rede de microfibrilas se assemelharem com o colágeno (BODIN *et al.*, 2007; FINK, 2009). A CB apresenta outras particularidades relevantes, como alta resistência (devido ao embaraçamento de suas fibras), membrana ultrafina, alta cristalinidade (70-80%), ampla rede de nanofibrilas que são centenas de vezes menores que as fibrilas da celulose vegetal (na ordem de 100 nm de diâmetro) e um alto grau de retenção de água, proporcionando a formação de hidrogéis, ou seja, celulose hidratada (BODIN *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SCHUMANN *et al.*, 2009).

. A cristalinidade da CB pode variar de acordo como o tipo de produção: a CB obtida por produção estática apresenta cristalinidade menor do que a CB produzida em agitação (FINK, 2009).

Com capacidade de retenção de água de cerca de 100 a 120 vezes a sua massa seca, a CB forma hidrogéis dos quais 1% de sua composição é de microestrutura de celulose bacteriana e 99% é de água. Essa hidratação promove um intumescimento da estrutura fibrosa formando assim espaços entre os feixes de fibras, fato esse que proporciona um ambiente ideal para o crescimento e a proliferação de células implantadas, além de o hidrogel apresentar propriedades mecânicas similares ao dos tecidos, o que faz do hidrogel de CB um biomaterial adequado para matrizes ou *scaffold* 3D para utilização em engenharia de tecidos (BODIN *et al.*, 2007; SCHUMANN *et al.*, 2009; WIPPERMANN *et al.*, 2009).

Esse polímero de origem bacteriana possui sua estrutura formada por ligações entre unidades de beta-D-glucopiranosose ou anidroglicose (AGU) que estão unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo beta 1→4. Cada unidade de anidroglicose (Figura 3) contém três grupos de hidroxilas (OH) livres, ligados aos carbonos 2, 3 e 6, que podem ter seus

hidrogênios (H) substituídos por outros grupos como o etila, metila ou carboxila (KACURÁKOVÁ *et al.*, 2002; REIS, 2010).

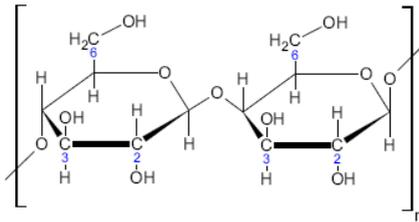


Figura 3 - Estrutura Química da Celulose. Fonte: VIEIRA, 2004 apud OLIVEIRA (2009).

O comprimento da cadeia de celulose é expresso em números de constituintes de AGU, apresentando um grau de polimerização (GP) – número de unidades repetidas na cadeia – de aproximadamente 2800, o que corresponde a uma massa molar de $453.000\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O comportamento físico-químico da celulose se deve aos grupos hidroxilas que podem formar ligações de hidrogênio, ou “pontes” intramoleculares entre unidades de glicose, formando as cadeias e proporcionando rigidez, e as ligações intermoleculares, com moléculas adjacentes formando os feixes; as moléculas se alinham formando as microfibrilas, que formam as fibrilas; estas, por sua vez, se ordenam de maneira a formar as paredes celulares das fibras. As ligações de hidrogênio são responsáveis pela tendência da celulose em formar cristais, fato este que a torna insolúvel em água, devido à escassez de grupos hidroxilas disponíveis para interagir com a água, bem como na maioria dos solventes orgânicos (CORRÊA, 2010; OLIVEIRA, 2009).

Muller e colaboradores (2011) estudaram as propriedades físicas de membranas de hidrogéis de celulose bacteriana e destes hidrogéis revestidos com polipirrol para avaliação da viabilidade da utilização destes hidrogéis como *scaffolds*. Como resultado as membranas de CB apresentaram uma resistência à tração de 0,7 MPa e um módulo de elasticidade de 3,4 MPa reafirmando o que a literatura diz sobre sua resistência mecânica.

A celulose é composta por regiões amorfas, desordenadas, e regiões cristalinas, ordenadas, que coexistem entre si. Com fronteira não muito bem definida, essas regiões mostram a transição de um arranjo

ordenado para um estado desordenado, com orientação menor. A celulose nativa é composta por duas ou mais formas cristalinas distintas, principalmente das fases alfa-1 e beta-1. Estudos de difração e microscopia eletrônica demonstraram que as diferentes formas cristalinas coexistiam dentro da microfibrila de celulose. A fibra da região cristalina apresenta maior resistência ao alongamento, tração e solvatação. Através do processo hidrotérmico com soluções alcalinas transforma-se a fase alfa-1, predominante na celulose bacteriana e termodinamicamente em equilíbrio térmico, em fase beta-1 que é mais estável termicamente. Um desses processos hidrotérmicos mais utilizados é a mercerização, processo no qual as fibras sofrem inchamento quando tratadas com alguns agentes químicos, como o hidróxido de sódio (GEORGE *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

2.2.1.1.1 *Tratamento químico para purificação da celulose bacteriana*

No processo de purificação não há a solubilização da celulose, mantendo assim a estrutura de suas fibras.

A celulose nativa (alfa-1), quando tratada com solução alcalina, “incha” de acordo com a concentração e tipo da solução. Por exemplo, no tratamento com soluções de NaOH em baixas concentrações, os íons Na^+ ocupam os maiores poros existentes na CB, enquanto no tratamento com as soluções de maior concentração os poros menores também são ocupados. Assim, quanto maior a concentração da solução, maior será o número de poros ocupados e maior será o afrouxamento entre as fibras, pois o diâmetro do Na^+ é suficiente para penetrar e alargar os menores poros e avançar entre os planos cristalinos (GEORGE *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

Após o tratamento alcalino, a celulose é lavada com água destilada para a remoção dos cátions (Na^+) e ocorre a formação de outro tipo de reticulado cristalino, a fase beta-1, que termodinamicamente é mais estável que a alfa-1 (nativa). Como produto desse processo de purificação em solução alcalina obtém-se a álcali-celulose ou celulose alcalina (GEORGE *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

2.3 Desenvolvimento de vasos a partir de celulose bacteriana

Devido as suas propriedades, a celulose bacteriana tem se mostrado um biomaterial ideal para a construção de *scaffolds*. Nessa linha alguns grupos de pesquisa já vêm utilizando a CB como matriz de vasos sanguíneos artificiais.

Em 2001 o alemão Klemm e colaboradores desenvolveram tubos de celulose bacteriana para uso na substituição de vasos sanguíneos injuriados. O produto foi patenteado como BASIC[®] e desde então, diversos testes foram realizados, como a substituição de artérias de ratos e suínos. Nos experimentos com ratos mostrou-se de forma nítida que os segmentos de vasos de CB implantados desenvolveram vasculogênese e inclusive inervação. Nos suínos, de uma forma mais lenta, também foram obtidos resultados satisfatórios (KLEMM *et al.*, 2001; SCHUMANN *et al.*, 2009; WIPPERMANN *et al.*, 2009).

Em 2007, Bodin e colaboradores produziram vasos de CB utilizando silicone como matriz de formação dos vasos e ainda injeção de oxigênio dentro dos fermentadores a fim de analisar a influência deste na produção de celulose (Figura 4).

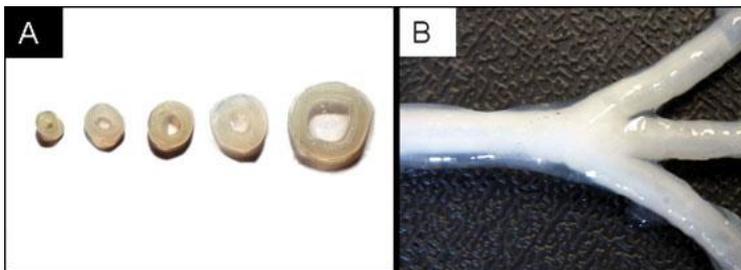


Figura 4 - Fermentação com injeção de O₂. Fonte: BODIN *et al.*, 2007.

Seguindo a mesma linha na Suécia, Fink (2009) produziu tubos de celulose bacteriana para uso como vasos artificiais. Para a produção desses vasos foi desenvolvido um biorreator (Figura 5). Os estudos incluíam modificações de superfície da celulose com proativos para aderência endotelial, diminuição da coagulação e inclusive a criação de um sistema circulatório de sangue extracorpóreo com esses tubos de CB para analisar o comportamento do biomaterial com o sangue. O estudo ainda afirma que as propriedades mecânicas dos vasos de CB se assemelham as de uma artéria carótida suína.



Figura 5 - Biorreator para produção de vasos de CB. Fonte: FINK, 2009.

O substituto ideal de um vaso sanguíneo deve promover a endotelização e servir de matriz para a formação de um novo vaso. Os vasos de CB apresentam boas características cirúrgicas como o manuseio e sutura do biomaterial e o restabelecimento imediato do fluxo sanguíneo após a completa anastomose (WIPPERMANN *et al.*, 2009). Estudos de substituição da artéria carótidas de suínos por vasos de CB mostraram que não houve “dilatação, abertura da sutura ou formação de aneurismas”, além do vaso artificial não sofrer alterações significativas no seu diâmetro após 90 dias do implante (SCHUMANN *et al.*, 2009; WIPPERMANN *et al.*, 2009). Os mesmos estudos ainda mostram que os vasos artificiais permitiram a endotelização e formação de tecido tri-lamelar com estrutura semelhante à da carótida normal, fato este que demonstra que o implante de células ou fatores de crescimento na matriz é dispensável tornando o procedimento mais prático (BODIN *et al.*, 2007; SCHUMANN *et al.*, 2009; WIPPERMANN *et al.*, 2009).

2.4 A vida útil do biomaterial no organismo: degradação

Na degradação polimérica há cisão das ligações primárias da cadeia principal do polímero, possibilitando, assim, a formação de outras ligações e a consequente mudança da estrutura química e das propriedades físico-químicas do material, incluindo a redução da massa molecular (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O produto da degradação da CB é a glicose, fenômeno este que não é detectável *in vivo*. Em alguns estudos utiliza-se C14 radioativo para marcação da celulose e visualização da sua degradação no organismo, porém essa técnica se torna muito dispendiosa, pois necessita de aparelhos de alto custo para a análise posterior do material. *In vitro* são comumente realizados ensaios de degradação de polímeros, o que também torna possível avaliar a degradação da celulose (CHEN *et al.*, 2009).

Em um estudo de Chen e colaboradores (2009) foi analisada a degradação de membranas de celulose bacteriana nas dimensões de 5 mm \pm 0,5 mm de comprimento e 5 mm \pm 0,5 mm de largura imersas em PBS (*Phosphate buffered saline*), i.e., solução salina tamponada com fosfato a 0.1 mol·l⁻¹ e pH de 7,25 e incubadas a 37°C por 12 semanas. O material e a solução de imersão foram analisados em FEG-SEM (Microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo) e em espectrofotometria de UV para análise de açúcar redutor; essas análises demonstraram que a taxa de degradação da CB em PBS foi menor que 8% nas 12 semanas do ensaio. O estudo ainda contou com a avaliação de citotoxicidade dos produtos da degradação da celulose e os resultados corroboram o que outros estudos já haviam concluído: que produtos à base de celulose bacteriana, como os aqui estudados, não demonstram citotoxicidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo principal desse trabalho é produzir, caracterizar e estudar a degradabilidade *in vitro* de vasos sanguíneos artificiais obtidos a partir de celulose bacteriana.

3.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver um método para a produção *in vitro* de vasos sanguíneos artificiais a partir de celulose bacteriana;
2. Purificar os vasos em diferentes concentrações de solvente para verificar se há mudança na conformação da rede de fibras celulósicas;
3. Comparar a estrutura de formação dos vasos em microscopia eletrônica de varredura (MEV);
4. Realizar ensaios de degradação de segmentos dos vasos em condições fisiológicas simuladas;
5. Pesquisar por espectrofotometria no UV-VIS a presença de glicose nos fluidos pós-ensaio de degradação como positivo para degradação dos vasos;
6. Observar ao MEV os vasos pós-ensaio de degradação para verificar mudanças estruturais que caracterizem degradação dos vasos.

4 METODOLOGIA

Descreve-se abaixo a metodologia experimental para realização de ensaios para a produção, caracterização e ensaios de degradação de vasos de celulose bacteriana. Um fluxograma dos principais passos realizados está representado na Figura 6.

O trabalho foi todo desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLab) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) do campus de Florianópolis.

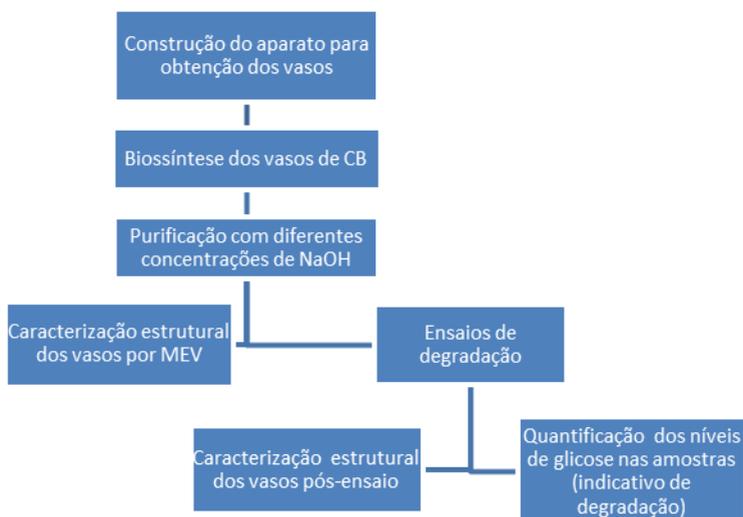


Figura 6 - Fluxograma geral da metodologia utilizada.

4 Obtenção dos vasos artificiais: obtenção, tratamento e caracterização

A celulose utilizada nesse estudo foi sintetizada pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769 da “Coleção de Culturas Tropicais (CCT)” da Fundação André Tosello, Campinas-SP, Brasil. A síntese ocorreu em meio de cultura específico para a produção

de celulose contendo 25g de manitol, 5 g de extrato de levedura e 3 g peptona em 1 litro de água destilada.

Para a obtenção dos vasos de celulose bacteriana construiu-se um aparato (Figura 7) de baixo custo em silicone inspirado nos trabalhos de Fink (2009), Klemm (2001), Wippermann *et al* (2009), Bodin *et al.* (2007) e Schumann *et al.*(2009). No aparato foi introduzido o meio de cultura já inoculado com a *G. hansenii* em uma razão de 10% v/v, para tanto se preparou previamente este inóculo em um recipiente estéril contendo o meio de cultura e a bactéria. A bactéria foi obtida a partir de uma suspensão estoque de bactérias. O crescimento ocorreu em condição estática, à temperatura ambiente (25°C), durante um período de sete dias. Para esse protocolo de biossíntese de celulose bacteriana foram seguidos os métodos já desenvolvidos por Recouvreur (2008).

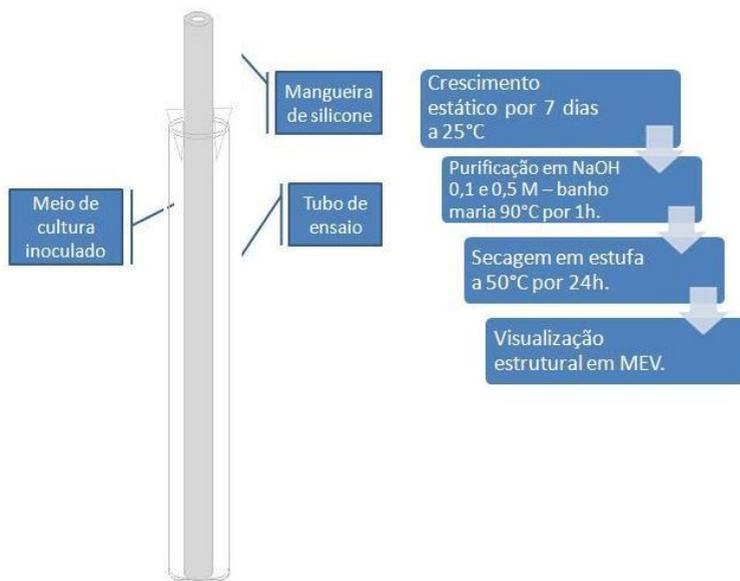


Figura 7 - Aparato para produção de vasos de CB.

A partir desse aparato (Figura 7) foram desenvolvidos vasos sanguíneos artificiais de celulose bacteriana de 15 cm de comprimento por 12 mm de diâmetro interno e 1 mm de espessura de parede. Os vasos

de CB obtidos foram lavados em água destilada e purificados em solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,1M e 0,5M em banho-maria a 90°C durante 1 hora. As molaridades de 0,1 e 0,5 são padrões de purificação de CB encontrados na literatura e nesse trabalho foram realizadas as duas concentrações para comparar se há diferença no afrouxamento das fibras nestes dois tratamentos. Essas concentrações estão dentro da faixa permitida pelo FDA (*Food and drug administration*) referente a materiais para implantes *in vivo*. A caracterização estrutural dos vasos foi feita por microscopia eletrônica de varredura utilizando um aparelho da marca JEOL, modelo JSM-6390LV, em 15 kV do Laboratório Central de Microscopia (LCME) da UFSC. Para a análise em MEV as amostras foram liofilizadas, fixadas com fita de carbono sobre *stubs* e recobertas com ouro.

4.2 Estudos da degradação da Celulose Bacteriana

Faz-se necessário estudar a degradação da CB para que se possa prever seu tempo de vida útil em um organismo para aplicações em engenharia de tecidos. Sabe-se que se trata de um biopolímero de anidroglicose, portanto espera-se que durante a sua degradação seu produto final seja a glicose. Para confirmar essa hipótese foram realizados ensaios de degradação *in vitro* dos vasos de CB obtidos neste trabalho em fluidos que simulam os fisiológicos.

4.2.1 Segmentos de Vasos de Celulose Bacteriana

Para os ensaios de degradação dos vasos de celulose bacteriana, os vasos tratados em NaOH 0,1M e 0,5M foram segmentados em anéis de 3 cm de comprimento, 12 mm de diâmetro interno e 1 mm de espessura de parede. Esses segmentos foram colocados em soluções de PBS ou Salina (NaCl 0,9%), ambas soluções com pH de 7,42 (próximo ao fisiológico), autoclavados e deixados em incubadora a 37,8°C.

Os grupos analisados foram separados em: PBS/NaOH 0,1 M, Salina/NaOH 0,1 M, PBS/NaOH 0,5 M e Salina/NaOH 0,5 M. Cada grupo foi feito em triplicata.

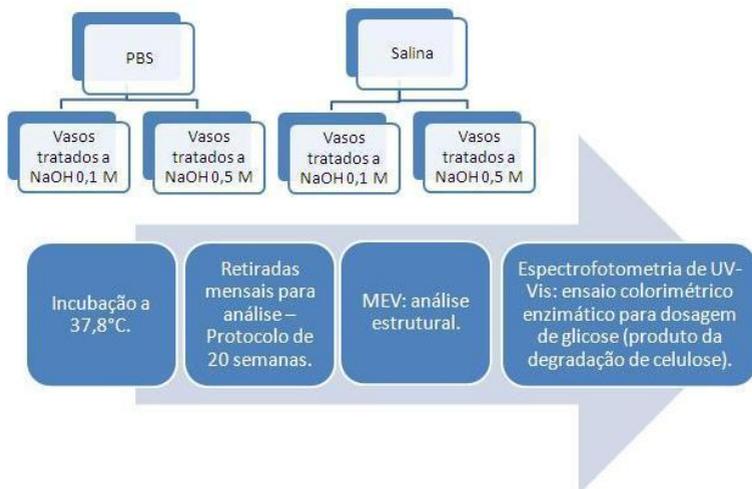


Figura 8 - Protocolo de degradação dos vasos de CB.

Os ensaios de degradação dos vasos seguiram um protocolo de 20 semanas (Figura 8) em que nos tempos de 0, 4, 8, 12, 16 e 20 semanas foram realizadas as dosagens dos níveis de glicose através de espectrofotometria UV-VIS. As amostras pós-incubação foram observadas em MEV para acompanhamento do comportamento das fibras celulósicas durante a degradação. A metodologia para esses ensaios foi uma adaptação dos estudos de Chen e colaboradores (2009).

4.2.2 Espectrofotometria de UV-VIS

A concentração de glicose nas amostras foi quantificada por teste enzimático colorimétrico para dosagem da glicose em fluidos orgânicos da Bioliquid (Laborclin, Pinhais-PR). As leituras foram realizadas utilizando-se o Espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu, modelo UV Mini 1240, do Laboratório de Transferência de Massa (LABMASSA).

O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante onde se ajustou o comprimento de onda do espectrofotômetro para a faixa entre 600–190 nm.

Tubos de ensaio devidamente identificados foram alíquotados à base de 2 mL do reagente de trabalho em cada tubo, adicionados de 20

μL da amostra correspondente a cada tubo, com exceção do tubo "branco" em que havia somente água e do tubo "padrão" onde foram adicionados 20 μL da solução padrão do *kit* que contém uma concentração conhecida de glicose. Após a homogeneização, os tubos foram incubados por 10 minutos a 37°C em banho-maria para posterior leitura no espectrofotômetro.

Uma vez lida a absorvância dos tubos de amostra e padrão, acertando o zero com o branco, foram efetuados os seguintes cálculos:

Fator de cálculo = $100/\text{Absorvância do padrão}$

Glicose [mg/dL] = Absorvância do teste \times Fator de cálculo

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura dos Vasos

A caracterização estrutural dos vasos foi feita por microscopia eletrônica de varredura, utilizando um aparelho da marca JEOL, modelo JSM-6390LV, em 15 kV do Laboratório Central de Microscopia (LCME) da UFSC. Para a análise em MEV as amostras foram liofilizadas, fixadas com fita de carbono sobre *stubs* e recobertas com ouro. As análises compreenderam a verificação da conformação da rede de fibras dos vasos de CB pós-ensaios de degradação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e caracterização dos vasos

Em meio de cultura líquido e específico, a espécie *G. hansenii* produz hidrogéis de celulose na interface ar/líquido com formatos variados, de acordo com o recipiente de cultura, com o tipo de produção (estática ou em agitação) e de acordo com o tempo de incubação. Em culturas estáticas, o tempo é o agente determinante da densidade do hidrogel: quanto maior o tempo, maior o número de filamentos celulósicos formados, o que resulta na formação de hidrogéis mais densos e menos translúcidos do que os hidrogéis formados em tempos de incubação menores.

A partir do princípio da produção de hidrogéis de celulose bacteriana em crescimento estático foi proposto nesse trabalho o desenvolvimento de um aparato para a produção de vasos sanguíneos artificiais à base de celulose bacteriana como mostrados na Figura 4.

O aparato (Figura 9a) desenvolvido foi baseado nos métodos já existentes para a produção de vasos de CB, porém apresenta um layout diferenciado e mais simples dos apresentados até então. O aparato é de fácil reprodução e composto por componentes de preço acessível (tubo de ensaio de vidro e mangueira de silicone). O princípio desse layout possibilita o desenvolvimento de vasos de calibres diferenciados de acordo com ajustes que podem ser feitos com a variação no diâmetro do tubo de ensaio e, essencialmente, variando-se o diâmetro externo da mangueira de silicone que é a base primordial para o controle e molde do diâmetro interno do vaso. A ideia mostra que não se faz necessário a construção e adaptação de biorreatores e nem a perfusão de oxigênio durante o processo nesses fermentadores, técnicas essas que encarecem o processo e podem demorar longos períodos até a construção desses aparatos.

O silicone é o material de escolha no aparato por suportar a temperatura de autoclavagem (121°C) e por ser um material que apresenta porosidade. Essa porosidade impede a migração de bactérias, mas permite a difusão de oxigênio, esse fato também foi observado por Bodin *et al.* (2007) em seu trabalho de desenvolvimento de vasos em material de silicone com controle de difusão de diferentes índices de oxigênio durante o processo de incubação.

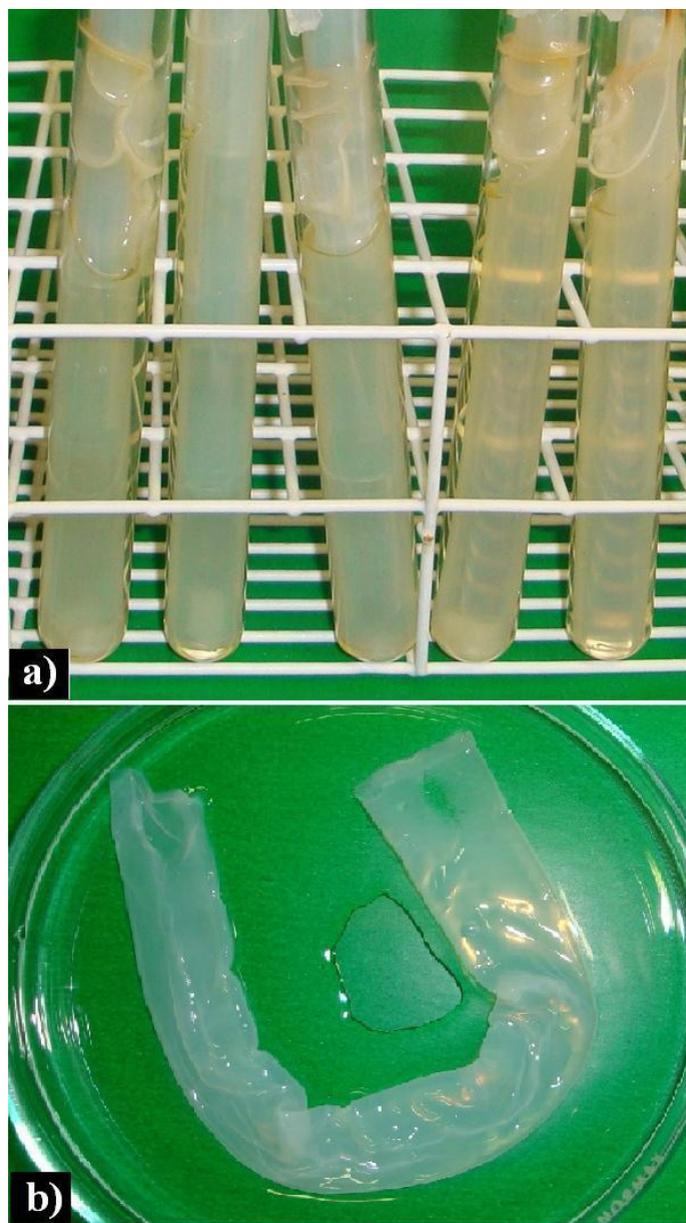


Figura 9–Vasos de celulose bacteriana: a) aparato; b) vaso.

Os vasos de CB produzidos neste trabalho apresentavam as dimensões de 15 cm de comprimento, 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Esses vasos após a purificação com NaOH apresentam-se como hidrogéis translúcidos de acordo com a visualização da Figura 9b. Os vasos de CB, uma vez secos, apresentam aparência diferenciada dos hidrogéis e mesmo reidratados não recuperam o mesmo grau de hidratação. Conforme o tipo de secagem, em estufa ou liofilização, os vasos tomam aspectos diferenciados entre si como se pode observar na Figura 10.

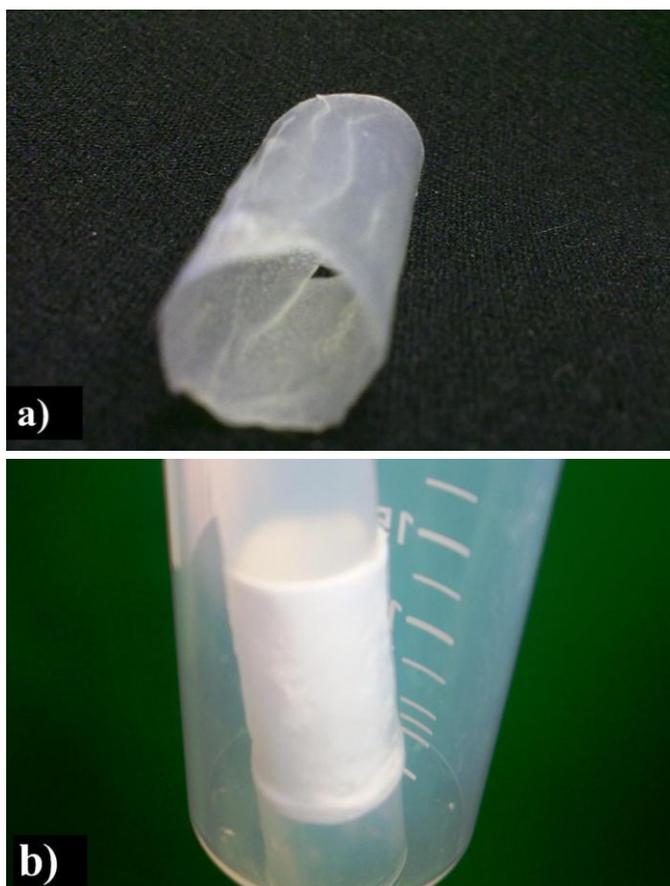


Figura 10– Vasos após secagem: a) estufa a 50°C por 24 horas; b) liofilizado.

Os vasos secos em estufa (Figura 10a) apresentam aspecto de papiro fino e delicado, porém resistente à fratura – somente lâminas afiadas ou fratura em nitrogênio líquido permitem romper suas fibras. Já os vasos liofilizados (Figura 10b) assemelham-se a um tubo de isopor e apresentam estrutura de rede de fibras mais semelhantes ao do hidrogel, pois no processo de liofilização os vasos são congelados e tem a água retirada por vácuo para secagem. Esse processo faz com que os feixes de fibras e as lacunas entre esses feixes, antes ocupadas pela água, permaneçam como no hidrogel. A partir dessa observação da secagem por liofilização todas as amostras de vasos para avaliação em microscopia eletrônica de varredura foram previamente liofilizadas. Para a melhor visualização ao MEV os vasos foram cortados com lâminas de bisturi e visualizados, longitudinalmente, cortes das suas paredes internas e externas como mostra a Figura 11.

Na análise das micrografias observa-se na superfície interna do vaso (Figura 11a) que há a deposição de celulose pelas bactérias de forma radial. Isso acontece devido ao fato das bactérias depositarem a celulose na parede externa da mangueira de silicone formando camadas e até grumos que estão mais evidentes na figura. Essa formação de camadas e aglomeração de grumos faz com que a parede interna do vaso tenha uma rede de fibras mais fechada e compacta que se afrouxa conforme atinge a parede externa. Na visualização da superfície externa do vaso (Figura 11b) pode-se notar uma menor densidade de fibras em comparação à parede interna e um aspecto menos denso e mais gelatinoso quando palpável ao hidrogel.

O fato dos vasos de CB possuírem maior densidade na parte interna (lúmen) é um fator positivo, pois assegura que os elementos figurados circulantes do sangue e o plasma não escapem para o resto do organismo por atravessamento das paredes dos vasos de CB.. Assim, o fluxo sanguíneo poderá ser restabelecido logo após anastomose completa obtida por uma cirurgia intervencionista (BODIN *et al.*, 2007).

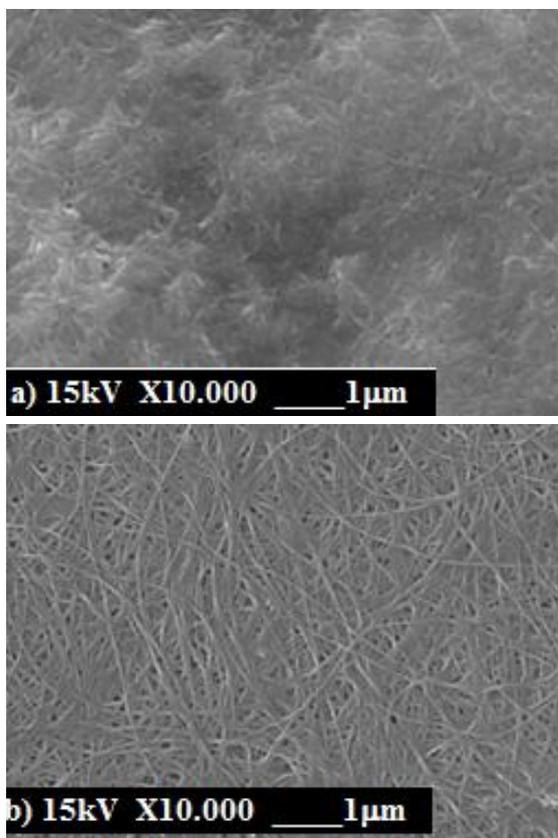


Figura 11– Micrografias de MEV de um vaso liofilizado: a) superfície interna, b) superfície externa.

5.1.1 Mercerização

Neste trabalho os vasos foram purificados em diferentes concentrações de NaOH: a 0,1 M e a 0,5 M. Essas concentrações (ou 0,1 ou 0,5 M) já são utilizadas na literatura como padrão para purificação de membranas de CB, porém não são comparadas frente a frente para se visualizar a diferença que podem provocar no afrouxamento das fibras das CBs tratadas por uma ou outra concentração.

Na Figura 12 as micrografias revelam que os vasos de CB tratados com NaOH 0,1 M mostram-se densos (Figura 12a), ou seja, apresentam fibras mais fechadas, enquanto que aqueles tratados com NaOH 0,5 M (Figura 12b) possuem maior espaçamento entre as fibras, apresentando-se porosos. Esse comportamento pode ser explicado, pois na mercerização com NaOH ocorre o afrouxamento das fibras devido às lacunas deixadas pelos íons sódio ao penetrar entre os espaços das fibras. Assim, quanto maior a concentração da solução de NaOH, maior o número desses íons que penetram entre as fibras tornando conseqüentemente mais frouxo o arranjo estrutural da CB (GEORGE *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

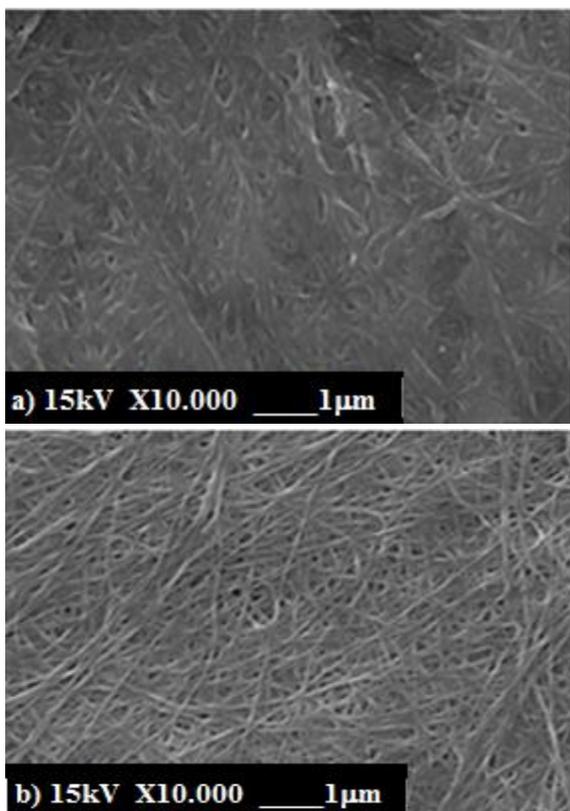


Figura 12– Micrografias obtidas por MEV dos vasos de CB tratados com NaOH em diferentes concentrações: a) 0,1 M e b) 0,5 M.

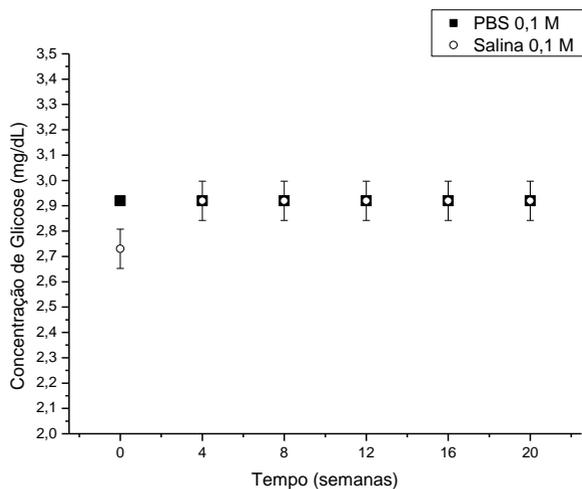
Pensando na diferença dos afrouxamentos de fibras apresentados acima, na próxima etapa do trabalho (degradação) foram utilizados vasos tratados em NaOH 0,1 M e também tratados em 0,5 M para verificar se os tratados em maior concentração tendem a se degradar mais rapidamente.

5.1.2 Ensaios de degradação dos vasos de celulose bacteriana

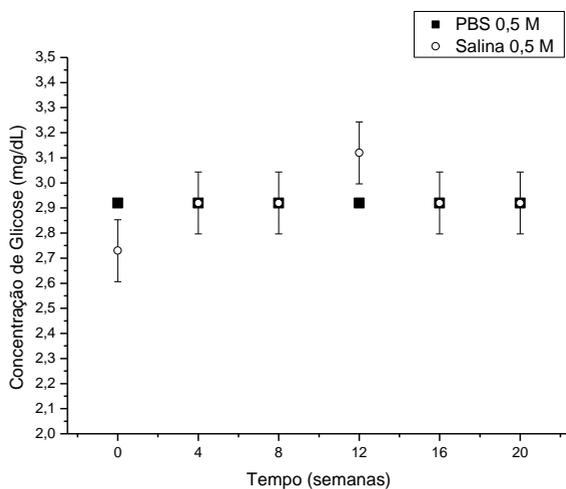
No ensaio de degradação dos vasos de celulose bacteriana foram incubadas amostras em triplicata para cada grupo. Para as análises em espectrofotometria no UV-VIS foram realizadas análises triplicadas em cada amostra. Após o tratamento de dados, foram estabelecidas médias para cada grupo que está representado nos pontos dos gráficos (representativos para as amostras das semanas indicadas) da Figura 13.

A análise das amostras por espectrofotometria no UV-VIS para glicose foi comparada com os controles (tempo zero). Esses controles eram compostos de 2 mL de reagente de cor (kit) com a adição de 20 μ L de PBS ou de solução salina, de acordo com o grupo da amostra. A Figura 13 apresenta a concentração de glicose (mg/dL) em função do tempo de degradação (semanas). A glicose foi avaliada nos líquidos (PBS ou salina) em que os vasos ficaram imersos durante os ensaios de degradação.

Os pontos dos gráficos representam médias das análises mensais e demonstram que nas amostras de PBS/NaOH 0,1 M os valores encontrados para glicose foram iguais aos do controle, ou seja, não apresentavam glicose, não havendo, portanto, degradação nessas amostras. Já as amostras de salina na Figura 13a seguiram um mesmo padrão de constância, apresentando os mesmos valores durante as semanas de 4 a 20, porém diferiram unicamente do valor da amostra controle, mas mantendo-se dentro do erro médio e apresentando um desvio padrão relativamente baixo. Os valores são obtidos pelos apresentados pela máquina (espectrofotômetro) e devido aos resultados obtidos no grupo salina/NaOH 0,1 M, acredita-se que possa ter ocorrido erro na leitura da amostra controle. Nas amostras de salina também não houve degradação de acordo com os valores constantes em todo o tempo de estudo.



a)



b)

Figura 13 – Concentração de glicose nas amostras durante os ensaios de degradação dos vasos de CB: a) vasos tratados com NaOH 0,1 M (desvio padrão de 0 para PBS e 0,84515 para Salina); b) vasos tratados com NaOH 0,5 M (desvio padrão de 0 para PBS e 0,11957 para Salina).

Na Figura 13b ocorre a mesma situação que na Figura 8a: as amostras de PBS/NaOH 0,5 M ao longo do estudo apresentaram os mesmos valores encontrados para a amostra controles; e as amostras de salina/NaOH 0,5 M apresentam valores diferentes da amostra controle, porém são valores constantes ao longo do tempo, com exceção da leitura na 12^a semana que apresentou uma média acima das outras. Os resultados desses dois grupos também não são indicativos de degradação devido aos valores constantes que apresentaram ao longo das 20 semanas de ensaios.

Enquanto os líquidos de imersão dos vasos eram analisados em espectrofotometria no UV-VIS, os vasos que estavam imersos nesses líquidos foram liofilizados e analisados por microscopia eletrônica de varredura. Essa análise visou o acompanhamento do comportamento da rede estrutural dos vasos ao longo de todo o período dos ensaios de degradação, tomando como base de análise a caracterização feita anteriormente nos vasos pós-purificação (Figuras 11 e 12).

A Figura 14 apresenta micrografias de MEV das amostras após os ensaios de degradação. Observa-se que não houve alteração estrutural aparente que seja significativa de degradação em nenhum grupo das amostras – se comparados a micrografias dos vasos que não foram submetidos ao ensaio de degradação (Figuras 11 e 12). Nas micrografias das amostras imersas em salina pode-se observar a presença de precipitados de sais de sódio depositados entre as fibras, sendo resquícios devido ao tempo de incubação nesta solução. A Figura 14 também corrobora, assim como nas Figuras 11 e 12, o fato da parede interna ser mais densa em fibras do que a parede externa, observação esta também feita por Bodin *et al.* (2007) e Wippermann *et al.* (2009).

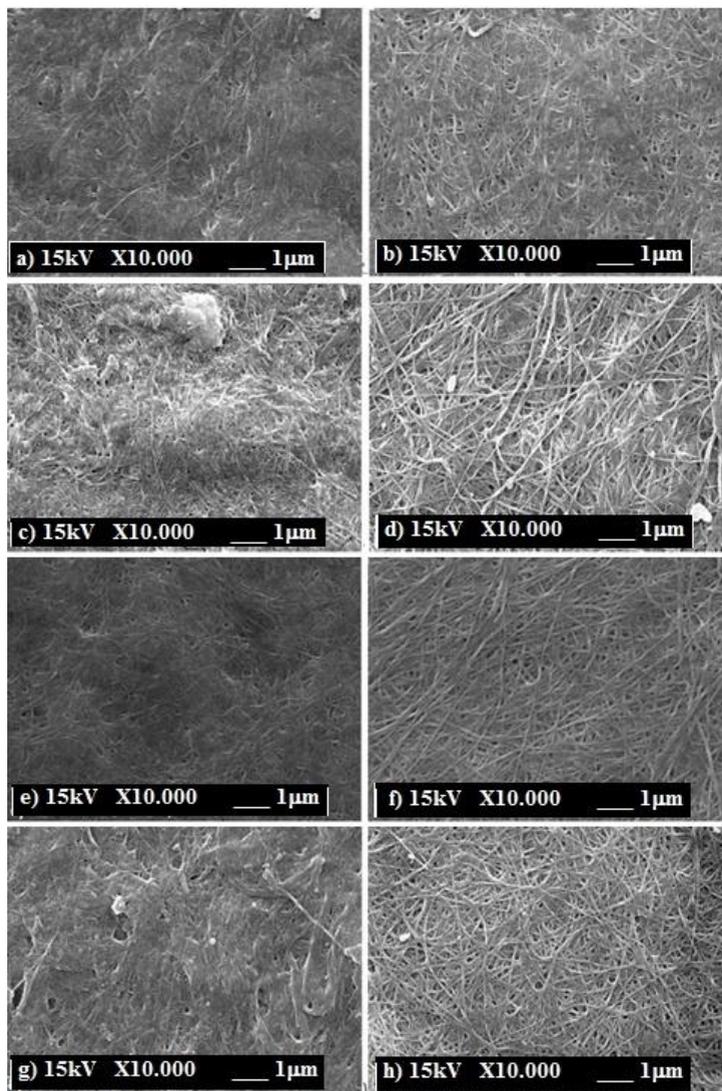


Figura 14 – Micrografias de MEV dos vasos submetidos ao ensaio de degradação: tratados com NaOH 0,1 M e imersos em PBS (a e b) e Salina (c e d); tratados com NaOH 0,5 M e imersos em PBS (e e f) e Salina (g e h). Micrografias da coluna esquerda são da parede interna dos vasos e da coluna direita são da parede externa.

A lenta degradação da celulose se deve ao fato de não haver celulasas nas soluções propostas para ensaio, pois essas soluções estavam simulando fluídos corpóreos com características semelhantes aos fisiológicos: pH de 7,42, temperatura de 37,8°C e composição com sais e íons que estão presentes no organismo. Sabe-se que a CB não será reabsorvida pelo organismo pela ausência dessas celulasas (SCHUMANN *et al.*, 2009). Porém, também é de conhecimento que a celulose pode se degradar devido à temperatura e outros fatores, fato esse observado por Chen e colaboradores (2009) que, em experimento semelhante ao deste trabalho, conseguiu um índice de degradação de <8% em 12 semanas para membranas de 5 mm \pm 0,5 mm de comprimento e 5 mm \pm 0,5 mm de largura, demonstrando que a celulose pode se degradar *in vitro* sem a presença de celulasas e provavelmente também se degradará *in vivo*, pois as condições impostas no seu trabalho simulavam condições fisiológicas.

Aparentemente, os vasos pós-ensaio, quando comparados com os vasos que não participaram dos ensaios de degradação, não apresentaram alterações em suas propriedades mecânicas ao manuseio. Desse modo, as propriedades mecânicas desses vasos implantados não se alterariam de forma a comprometer a eficácia do implante.

6 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram desenvolvidos ensaios para a produção, caracterização e estudo da degradabilidade *in vitro* de vasos sanguíneos artificiais à base de celulose bacteriana.

1. Foi elaborado um método de fácil reprodução para a produção *in vitro* de vasos sanguíneos artificiais de celulose bacteriana de diferentes calibres e comprimentos.
2. A purificação dos vasos com soluções de diferentes concentrações permite o controle da porosidade da rede de fibras da celulose bacteriana. Em soluções mais concentradas obteve-se um maior afrouxamento dessa rede.
3. Os vasos submetidos ao protocolo de 20 semanas de degradação não apresentaram mudanças visíveis. Da mesma forma os fluidos em que os vasos estiverem imersos durante o ensaio não apresentaram resquícios de glicose. Portanto, não houve degradação dos vasos sanguíneos artificiais à base de celulose bacteriana no período de estudo.
4. O fato de esses vasos terem uma lenta degradação demonstra-se vantajoso no âmbito em que a formação de um novo vaso por dentro dessa matriz de CB demanda tempo e para tanto a vaso artificial deve se degradar em tempo superior ao tempo da neovascularogênese.

7 SUGESTÕES

Sugere-se para trabalhos complementares o estudo das propriedades mecânicas dos vasos artificiais de celulose bacteriana durante os ensaios de degradação para a simulação e verificação da resistência vascular desses vasos durante o tempo de permanência no organismo.

Ainda para ensaios de degradação faz-se como sugestão o estudo da degradação *in vitro* por um período maior do que 20 semanas, assim como o estudo da degradação em sistemas extracorpóreos de circulação sanguínea para a avaliação da degradabilidade desses vasos frente a uma condição mais próxima ao do organismo.

8 REFERÊNCIAS

- AOUADA, F. A.; MUNIZ, E.C.; VAZ, C. M. P.; MATTOSO, L. H. C. **Correlação entre parâmetros da cinética de intumescimento com características estruturais e hidrofílicas de hidrogéis de poli(acrilamida e metilcelulose).** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 6, 2009.
- BODIN, A.; BACKDAHL, H.; FINK, H.; GUSTAFSSON, L.; RISBERG, B. & GATENHOLM, P. **Influence of Cultivation Conditions on Mechanical and Morphological Properties of Bacterial Cellulose Tubes.** Biotechnology and Bioengineering, 97, p.425-434 (2007).
- BURSAC, N., M. PAPADAKI, R. J. COHEN, F. J. SCHOEN, S. R. EISENBERG, R. CARRIER, G. VUNJAK-NOVAKOVIC, L. E. FREED. **Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies.** American Journal of Physiology, 277 (Heart and Circulatory Physiology 46): H433–H444, 1999.
- CHEN, Y.M.; XI, T.; ZHENG, Y.; GUO, T.; HOU, J.; WAN, Y.; GAO, C. **In Vitro Cytotoxicity of Bacterial Cellulose Scaffolds used for Tissue-engineered Bone.** Journal of Bioactive and Compatible Polymers; 24; 137, 2009.
- CORRÊA, A.C. **Preparação de nanofibras de celulose a partir de fibras de curauá para desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos com EVA.** Tese (Doutorado). São Carlos: UFSCar, 2010.
- EVANS, H.J.; SWEET, J.K.; PRICE, R.L.; YOST, M.; GOODWIN, R.L. **Novel 3D culture system for study of cardiac myocyte development.** American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 285: H570–H578, 2003.
- FINK, H. **Artificial blood vessels: Studies on endothelial cell and blood interactions with bacterial cellulose.** Doctoral Thesis for the degree of Doctor of Medicine. Vascular Engineering Centre at the Department of Surgery. Institute of Clinical Sciences. Sahlgrenska Academy at the University of Gothenburg. Göteborg, Suécia, 2009.

GEORGE, J.; RAMANA, K.V.; SABAPATHY, S.N.; JAGANNATH, J.H.; BAWA, A.S.. **Characterization of chemically treated bacterial (Acetobacterxylinum) biopolymer: Some thermo-mechanical properties.** International Journal of Biological Macromolecules 37 (2005) 189–194.

GOSS, C.M. (ed.). **Gray Anatomia.** 29 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

KACURÁKOVÁ, M.; SMITH, A.C.; GIDLEY, M.J.; WILSON, R.H.. **Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy.** Carbohydrate Research 337 , 1145–1153, 2002.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.; BOHN, A. **Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material.** Angewandte Chemie International, v. 44, p. 3358-3393, 2005.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. **Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery.** Progress in Polym. Sci., 26, p.1561-1603, 2001.

KOFIDIS, T.; AKHYARI, P.; WACHSMANN, B.; BOUBLIK, J.; MUELLER-STAHL, K.; LEYH, R.; FISCHER, S.; HAVERICH, A. **A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery.** European Journal of Cardio-thoracic Surgery 22 , p. 238–243, 2002.

KOFIDIS, T.; AKHYARI, P.; BOUBLIK, J.; THEODOROU, P.; MARTIN, U.; RUHPARWAR, A.; FISCHER, S.; ESCHENHAGEN, T.; KUBIS, H.P.; KRAFT, T.; LEYH, R.; HAVERICH, A.. **In vitro engineering of heart muscle: Artificial myocardial tissue.** The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 124:63-69, 2002.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. (editors). **Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control.** World Health Organization, Geneva, 2011.

MOOSAVI-NASAB, M.; YOUSEFI, A.R.. **Investigation of Physicochemical Properties of the Bacterial Cellulose Produced by *Gluconacetobacter xylinus* from Date Syrup**. World Academy of Science, Engineering and Technology 68, 2010.

MULLER, D. ; RAMBO, C.R. ; PORTO, L.M. ; BARRETO, P.L.M. ; BARRA, G. M. O.. **Hidrogéis de Celulose Bacteriana/Polipirrol: Avaliação das Propriedades Físicas**. In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 2011, Campos do Jordão. 11 CBPol- Congresso Brasileiro de Polímeros, 2011.

OLIVEIRA, G.C. **Síntese e caracterização da metilcelulose a partir do jornal reciclado para utilização como aditivo na construção civil**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química, 2009.

OLIVEIRA, A.F.; CRISTIANO, C.M.Z.; ANDREANI, L.; PORTO, L.C.; SOLDI, V. **Estudos cinéticos de degradação térmica de blendas formadas por carboximetilcelulose / goma guar ou hidroxipropilmetilcelulose**. 17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 15 a 19 de Novembro de 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

OLIVEIRA, R.L. ; OLIVEIRA, G.C.; MEIRELES, C.S.; ASSUNÇÃO, R.M.N.; BARUD, H.S.; RODRIGUES FILHO, G. MESSADEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L.. **Síntese e caracterização da celulose microcristalina a partir da celulose bacteriana**. VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria 25 a 28 de Abril de 2010 – São Paulo – SP – Brasil.

PAPADAKI, M., N. BURSAC, R. LANGER, J. MEROK, G. VUNJAK-NOVAKOVIC, AND L. E. FREED. **Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies**. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology 280: H168–H178, 2001.

PEREIRA, A.P.V.; VASCONCELOS, W.L.; ORÉFICE, R.L. **Novos biomateriais: híbridos orgânicos-inorgânicos bioativos**. Polímeros: Ciência e Tecnologia - Out/Dez - 99.

RAMBO, C.R., RECOUVREUX, D.O.S., CARMINATTI, C.A., PITLOVANCIV, A.K., ANTÔNIO, R.V., PORTO, L.M. **Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering.** Materials Science and Engineering C 28 (2008) 549–554.

RECOUVREUX, D.O.S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2008, 145p.

RECOUVREUX, D.O.S., RAMBO, C.R., BERTI, F.V., CARMINATTI, C.A., ANTÔNIO, R.V., PORTO, L.M. **Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration.** Materials Science and Engineering C 31 (2011) 151–157.

REIS, M.C. **Comportamento eletroquímica do sistema níquel(II)-carboximetilcelulose-água.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Química. Curitiba, 2010.

SALES, K.M.; SALACINSKI, H.J.; ALOBAID, N.; MIKHAIL, M.; BALAKRISHNAN, V.; SEIFALIAN, A.M. **Advancing vascular tissue engineering: the role of stem cell technology.** TRENDS in Biotechnology. Vol.23 No.9 September 2005.

SCHUMANN, D.D.; WIPPERMANN, J.; KLEMM, D.O.; KRAMER, F.; KOTH, D.; KOSMEHL, H.; WAHLERS, T.; SALEHI-GELANI, S. **Artificial vascular implants from bacterial cellulose: preliminary results of small arterial substitutes.** Cellulose (2009) 16:877–885.

VIEIRA, R.G.P. **Síntese e caracterização da metilcelulose a partir da metilação heterogênea do bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

WIPPERMANN, J.; SCHUMANN, D.; KLEMM, D.; KOSMEHL, H.; SALENI-GELANI, S.; WAHLERS, T. **Preliminary results of small arterial substitute performed with a new cylindrical biomaterial composed of bacterial cellulose.** European Journal of Vascular and Endovascular Surgery (2009) 37, 592-596.

ZIMMERMANN, W.-H.; SCHNEIDERBANGER, K.; SCHUBERT, P.; DIDIÉ, M.; MÜNDEL, F.; HEUBACH, J.F.; KOSTIN, S.; NEUHUBER, W.L.; ESCHENHAGEN, T. **Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct**. *Circulation Research*. 2002;90;223-230.