

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos

Derce de Oliveira Souza Recouvreux

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Luismar Marques Porto, *PhD* (EQA-UFSC)
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Regina Vasconcellos Antônio (BQA-UFSC)
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Rambo (PGMAT-UFSC)

Florianópolis - SC, 15 de dezembro 2008

Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos

Por

Derce de Oliveira Souza Recouvreux, *M.Eng.*

Tese julgada para a obtenção do título de **Doutor em Engenharia Química**, área de concentração **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. Luismar Marques Porto, *PhD*
Orientador

Prof^a. Dra. Regina Vasconcellos Antônio
Co-orientadora

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo
Co-orientador

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto
Coordenador do CPGENQ

Banca Examinadora:

Prof. Luismar Marques Porto, *PhD*

Prof^a. Dra. Regina Vasconcellos Antônio

Prof. Dr. Carlos Renato Rambo

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Dra. Janice Koepp

Prof. Dr. Armando José d`Acampora

Florianópolis, 15 de dezembro de 2008

RECOUVREUX, Derce de Oliveira Souza.

Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos. Florianópolis. UFSC, Centro Tecnológico, 2008, 145p.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Luismar Marques Porto, *PhD* (EQA-UFSC)

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Regina Vasconcellos Antônio (BQA-UFSC)

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Rambo (PGMAT-UFSC)

1. *Gluconacetobacter hansenii* 2. Celulose bacteriana 3. Biopolímero
4. Acemanana 5. Hidroxiapatita 6. Engenharia de tecidos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologias Integradas (InteLAB) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) do Departamento de Bioquímica, na Universidade Federal de Santa Catarina.

Dedico este trabalho aos meus filhos Ricardo e Catherine, a meu marido Sergio e a meus pais Herculano (*in memoriam*) e Maria, por todo amor, incentivo e carinho. Vocês são muito importantes para mim.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

O desenvolvimento desta pesquisa contou com o apoio financeiro da
CAPES/CNPq a quem estendemos nossos agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – UFSC.

Agradeço aos meus orientadores: Professor Luismar Marques Porto,
Professora Regina Vasconcellos Antônio e Professor Carlos Renato Rambo pelos
conhecimentos transmitidos, amizade, incentivo, apoio e ajuda na realização deste
trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química da
UFSC agradeço pelos conhecimentos transmitidos.

Especial agradecimento ao Edevilson, sempre nos atendendo com muito
carinho e atenção.

A todos os colegas do IntelAB, LBBMM e CERMAT, que de alguma forma
contribuíram para que este trabalho fosse realizado, em especial Ana Kelly,
Clayton, Claudimir, Cíntia, Diogo, Daliana, Fernanda, Julia, Itamar e Léo.

Ao Luciano Campestrini pelo gentil fornecimento de acemanana para
realização deste trabalho.

Agradecimento especial à Fundação André Tosello pela doação da bactéria
Glucoacetobacter hansenii ATCC 23769 (= *Acetobacter xylinum*).

Agradeço a minha família em especial aos meus pais pelo amor e incentivo.

Agradecimento especial ao meu marido, Sergio, meus filhos, Ricardo e
Catherine pelo amor e carinho com que me apoiaram e me incentivaram durante
toda esta jornada.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste
trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	XX
ABSTRACT	XXI
<i>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</i>	1
1.1 Introdução, motivação e justificativa	2
1.2 Objetivos	5
1.2.1 Objetivo geral.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
<i>CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i>	7
2.1 Celulose bacteriana	8
2.1.1 Breve histórico.....	8
2.1.2 Estrutura química da celulose bacteriana	9
2.1.3 Biossíntese de celulose bacteriana.....	11
2.1.4 Regulação da biossíntese de celulose bacteriana	13
2.1.5 Produção de celulose bacteriana	15
2.1.5.1 Cultura estática	15
2.1.5.2 Cultura agitada (agitador orbital)	16
2.1.6 Propriedades da celulose bacteriana	17
2.1.7 Aplicações da celulose bacteriana.....	18
2.2 Acemanana.....	19
2.3 Hidroxiapatita.....	21
2.4 Biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações médicas e de engenharia de tecidos.....	22
<i>CAPÍTULO 3 - MEMBRANA POROSA DE CELULOSE BACTERIANA PARA APLICAÇÕES EM ENGENHARIA DE TECIDOS</i>	24
Resumo.....	25

3.1	Introdução	25
3.2	Materiais e métodos	28
3.2.1	Produção de membranas porosas	28
3.2.1.1	Microrganismo	28
3.2.1.2	Preparação do inóculo para os experimentos	28
3.2.1.3	Meio e condições de cultivo	28
3.2.1.4	Purificação da celulose.....	29
3.2.2	Caracterização das membranas porosas	29
3.2.2.1	Microscopia óptica.....	29
3.2.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	30
3.2.2.3	Difratometria de raios X	30
3.2.2.4	Resistência à tração.....	30
3.3	Resultados e discussão	31
3.3.1	Produção da membrana porosa.....	31
3.3.2	Morfologia da membrana porosa	31
3.3.3	Avaliação da cristalinidade das membranas	33
3.3.4	Análise tensão-deformação da membrana porosa.....	34
3.4	Conclusões.....	36
CAPÍTULO 4 - CORPOS TRIDIMENSIONAIS DE HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA		37
	Resumo.....	38
4.1	Introdução	38
4.2	Materiais e métodos	40
4.2.1	Produção de corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-3D) e de membranas de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-M)	40
4.2.1.1	Meio e condições de cultivo	40
4.2.2	Dinâmica da produção dos corpos HCB-3D	40
4.2.3	Influência da agitação na produção dos corpos HCB-3D.....	41
4.2.3.1	Determinação da concentração de manitol em amostras do cultivo.....	42
4.2.3.2	Liofilização dos corpos HCB-3D	42
4.2.4	Caracterização dos corpos HCB-3D e de membranas HCB-M	43
4.2.4.1	Microporosidade.....	43
4.2.4.2	Resistência à tração.....	43
4.2.4.3	Conteúdo de água nos hidrogéis.....	43

4.2.4.4	Reidratação de CB corpos tridimensionais e CB membranas.....	44
4.3	Resultados e discussão	44
4.3.1	Metabolismo do manitol por <i>G. hansenii</i>	45
4.3.2	Produção de membranas HCB-M.....	48
4.3.3	Produção de corpos HCB-3D.....	48
4.3.4	Evolução temporal da formação dos corpos HCB-3D	51
4.3.5	Dinâmica de produção dos corpos HCB-3D	52
4.3.6	Influência da agitação na formação dos corpos HCB-3D	54
4.3.7	Caracterização dos corpos HCB-3D.....	58
4.3.7.1	Morfologia	58
4.3.7.2	Conteúdo de água nos hidrogéis	62
4.3.7.3	Reidratação da CB.....	62
4.3.7.4	Difração de raios X.....	63
4.3.7.5	Resistência à tração	65
4.4	Conclusões.....	66

CAPÍTULO 5 - CORPOS TRIDIMENSIONAIS DE HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA VASCULARIZADOS..... 68

	Resumo.....	69
5.1	Introdução	69
5.2	Materiais e métodos	72
5.2.1	Produção dos corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana vascularizados (HCB-3D-VAS).....	72
5.2.1.1	Meio e condições de cultivo	73
5.2.2	Caracterização dos corpos HCB-3D-VAS	73
5.3	Resultados e discussão	73
5.3.1	Produção dos corpos HCB-3D-VAS	73
5.3.2	Formação dos corpos HCB-3D	76
5.3.3	Morfologia da microestrutura dos corpos HCB-3D-VAS.....	77
5.4	Conclusões.....	81

CAPÍTULO 6 - COMPÓSITO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA-ACEMANANA . 82

Resumo.....	83
6.1 Introdução	83
6.2 Materiais e métodos	85
6.2.1 Produção do compósito hidrogel tridimensional de celulose bacteriana e acemanana (HCB-ACE).....	85
6.2.1.1 Meio e condições de cultivo	85
6.2.2 Caracterização do compósito HCB-ACE.....	85
6.2.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	86
6.3 Resultados e discussão	86
6.3.1 Produção do compósito de HCB-ACE	86
6.3.2 Formação de HCB-ACE.....	89
6.3.3 Caracterização do compósito HCB-ACE.....	90
6.3.3.1 Morfologia da microestrutura de amostras do compósito HC-ACE	90
6.3.3.2 Difração de raios X de amostras de ACE, da estrutura tridimensional HCB-3D e do compósito HCB-ACE	92
6.3.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de amostras de ACE, do corpo HCB-3D e do compósito HCB-ACE.....	94
6.4 Conclusões.....	97

CAPÍTULO 7 - COMPÓSITO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA-HIDROXIAPATITA 99

Resumo.....	100
7.1 Introdução	100
7.2 Materiais e métodos	101
7.2.1 Preparação do compósito HCB-HAp	101
7.3 Resultados	102
7.3.1 Produção do compósito HCB-HAp	102
7.3.2 Caracterização físico-química por MEV	103
7.3.3 Análise dos compostos químicos no compósito HCB-HAp	105

7.4 Conclusões.....	106
CAPÍTULO 8	107
8.1 Conclusões finais.....	108
8.2 Sugestões de trabalhos futuros.....	110
REFERÊNCIAS	111

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Estrutura química da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana (celulose), mostrando as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias de celulose. Adaptado de http://www.sameerrahatekar.org/Cellulose_Silk_IL.html	10
Figura 2.2 - Via de biossíntese de celulose por <i>Gluconacetobacter xylinus</i> , adaptado de (Ross <i>et al.</i> , 1991).	12
Figura 2.3 - Modelo da regulação de síntese de celulose bacteriana adaptado de Ross <i>et al.</i> , (1987).	14
Figura 2.4 - Controle do nível celular de c-di-GMP pelas enzimas diguanilato ciclase e fosfodiesterase, em <i>G. hansenii</i>	14
Figura 2.5 - Aplicações da celulose bacteriana na área biomédica. (a) e (b) substituto de pele (Czaja <i>et al.</i> , 2007); (c) e (d) vasos sanguíneos (Klemm <i>et al.</i> , 2001; Klemm <i>et al.</i> , 2006); (e) recuperação da dura-máter (Mello <i>et al.</i> , 1997; Mello <i>et al.</i> , 2001) e (f) como revestimento de <i>stents</i>	19
Figura 2.6 - Estrutura química da acemanana.....	20
Figura 3.1 - Possibilidades de aplicações da membrana de celulose bacteriana porosa em função do diâmetro dos poros.	27
Figura 3.2 - Fotografia da membrana de celulose bacteriana no estado hidratado.....	31
Figura 3.3 - Micrografias de MEV da superfície da membrana de celulose produzida por <i>G. hansenii</i> . (a) 4000 \times e (b) 8000 \times	32
Figura 3.4 - Micrografias ópticas (a,b) e MEV (c,d) das membranas de CBP. As Figuras b e d são imagens amplificadas das mesmas amostras das Figuras a e c, respectivamente.	33
Figura 3.5 - Resultados da difração de raios X das membranas de CB e de CBP. Os picos apresentados são característicos de celulose tipo I. (a) CB e (b) CBP.	34
Figura 3.6 - Curvas de tensão-deformação das membranas CB e CBP obtidas do ensaio de tração.	35
Figura 4.1 - Proposta para o metabolismo do manitol por <i>G. hansenii</i> , demonstrando a via bioquímica de produção de celulose, deduzida a partir	

de dados da literatura e do banco de dados do KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Ross <i>et al.</i> , 1991; Oikawa <i>et al.</i> , 1995; Dewulf <i>et al.</i> , 1996; Kanehisa e Goto, 2000).....	47
Figura 4.2 - Membrana de hidrogel de CB produzida por <i>G. hansenii</i> em condições estáticas.....	48
Figura 4.3 - Hidrogel de HCB-3D de formato variado, produzido por <i>G. hansenii</i> em agitador orbital. (a) Estruturas HCB-3D gelatinosas retiradas do meio de cultivo sem qualquer tratamento de purificação; (b) estruturas HCB-3D gelatinosas após tratamento de purificação.....	49
Figura 4.4 - Hidrogel HCB-3D produzido por <i>G. hansenii</i> em agitador orbital, (a) vista lateral e (b) vista frontal. Dimensões do elipsóide achatado: eixo maior = 13 cm; eixo menor = 5 cm, altura = 2,5 cm.	50
Figura 4.5 - Estrutura hidrogel de HCB-3D seccionada. (a) Vista lateral de HCB-3D seccionada e (b) vista frontal. Em (c), a membrana densa que reveste a estrutura de HCB-3D, e em (d) a massa gelatinosa que preenche o interior da estrutura.	50
Figura 4.6 - Evolução da formação de estruturas HCB-3D produzidas por <i>G. hansenii</i> em agitador orbital.....	51
Figura 4.7 - Dinâmica da produção dos corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana, em 13 ml de meio de cultivo.....	52
Figura 4.8 - Morfologia das estruturas macroscópica HCB 3D produzidas em agitador orbital. a) Velocidade de rotação 0,83 Hz e volume de meio de cultivo 60 ml, (1) mostra a superfície em contato com meio de cultivo e em (2) a superfície em contato com o ar, (b) 1,66 Hz, (c) 2,5 Hz e (d) 3,33 Hz. Para todas as velocidades de agitação foram utilizados volumes de meio de cultivo de 10, 20, 30, 40, 50, 60 ml.....	55
Figura 4.9 - (a) Massa seca de celulose em função da velocidade de agitação e do volume do meio de cultivo.....	57
Figura 4.10 - Conversão do substrato em celulose.	58
Figura 4.11 - Micrografias do MEV de amostra de HCB 3D liofilizada, sem o tratamento de purificação; ampliação 4000×. Bastonetes bacterianos entre as fibras de celulose.....	58

Figura 4.12 - Micrografias do MEV de amostras de CB-3D liofilizada produzidas por <i>G. hansenii</i> . Em (a), (b), (c), (d), (f), (g) e (h) corte transversal. Em (e) corte longitudinal. Ampliações: (a), (b), (c) e (d) 600×, (e) e (f) 800×, (g) 1600×, (h) 8000×.	60
Figura 4.13 - Morfologia da superfície e da região seccionada de uma estrutura HCB-3D observadas no MEV. (a) microestrutura da superfície. (b) fotografia de uma estrutura HCB-3D seccionada. (c) microestrutura da vista de um corte transversal. Ampliação 4000× e 1000×.	61
Figura 4.14 - Conteúdo de água nos corpos HCB-3D e nas membranas HCB-M..	62
Figura 4.15 - Reidratação dos corpos HCB-3D e das membranas HCB-M.	63
Figura 4.16 - Padrões de difração de raios X obtidos de amostras de HCB-3D. (a) amostras de HCB-3D e (b) amostras de HCB-M. Os planos de reflexão (110, 110 e 200) são característicos de celulose tipo I.	64
Figura 4.17 - Curva tensão-deformação da estrutura HCB-3D e de HCB-M sob força de tração.	65
Figura 5.1 - Diagrama esquemático da estrutura HCB-3D-VAS.	74
Figura 5.2 - Estrutura de HCB-3D-VAS seccionada com as seguintes dimensões no estado hidrogel: eixo maior = 80 mm; eixo menor = 50 mm, altura = 25 mm. (a) vista do corte longitudinal; (b) vista do corte transversal; (c) canal com diâmetro de 5 mm; (d) membrana densa que reveste externamente a estrutura; membrana densa que reveste o canal; (f) massa gelatinosa que constitui o interior da estrutura.	75
Figura 5.3 - Formação corpos HCD-3D-VAS. (a), (b) e (c) mostram a formação dos corpos, decorridos 2, 5 e 8 dias, respectivamente. (d) e (e) decorridos 2 e 8 dias, respectivamente. A diferença entre a formação das duas estruturas refere-se ao diâmetro dos fios utilizados e a forma como foram dispostos no frasco. As setas em (c) e (e) mostram o fio utilizado como molde para a formação do vaso.	76
Figura 5.4 - Micrografias de MEV de um vaso produzido na estrutura HCB-3D-VAS. De (a) a (f) detalham a superfície do vaso e da região que o sobrepõe. Ampliações: (a) 15×, (b) 100×, (c) 30×, (d) 120×, (e) 100×, (f) 400×, (g) 1200×, (h) 5000×.	79
Figura 5.5 - Morfologia da superfície e da região seccionada de uma estrutura HCB-3D-VAS, observado no MEV. Em (a) mostra o canal produzido na	

estrutura. Em (b) mostra uma fotografia de uma estrutura de HCB-3D-VAS seccionada longitudinalmente e transversalmente. Em (c) mostra a microestrutura da região que sobrepõe o canal.	80
Figura 6.1 - (a) Compósito HCB-ACE (celulose e acemanana), (b) HCB-3D (celulose nativa).	87
Figura 6.2 - Massa seca e conteúdo de água do compósito HCB-ACE em função da concentração de acemanana adicionada ao meio de cultivo.	88
Figura 6.3 - Evolução da formação do compósito HCB-ACE produzido por <i>G. hansenii</i> em agitador orbital, quando a adição de acemanana foi de 0,6 g·l ⁻¹ ...	89
Figura 6.4 - Micrografia de MEV de amostras liofilizadas da estrutura HCB-3D e do compósito HCB-ACE. (a) Superfície da estrutura HCB-3D, ampliação 8000×. (b) superfície da estrutura HCB-ACE, ampliação 8000×. (c) HCB-3D corte longitudinal, ampliação 800× e (d) HCB-ACE corte longitudinal, ampliação 1000×.	90
Figura 6.5 - Esquema da celulose sintetizada em meio contendo acemanana, mostrando a desordem causada na cristalização pela incorporação da acemanana entre as fibras e sobre as fibras durante o processo de cristalização. Adaptado de Tokoh e colaboradores (1998; 2002).	92
Figura 6.6 - Padrões de difração de raios X obtidos de amostras das estruturas HCD-3D, HCB-ACE e de acemanana moída.	93
Figura 6.7 - Espectros na região do infravermelho de amostras de acemanana moída (ACE), da estrutura tridimensional hidrogel de celulose bacteriana (HCD-3D) e do compósito hidrogel celulose bacteriana e acemanana (HCB-ACE).	96
Figura 6.8 - Espectros na região do infravermelho de amostras da estrutura tridimensional hidrogel de celulose bacteriana (HCD-3D) e do compósito hidrogel celulose bacteriana e acemanana (HCB-ACE). O detalhe mostra a banda 816 cm ⁻¹ do espectro HCB-ACE, características de glucomanana.	97
Figura 7.1 - (a) Fotografia de uma estrutura tridimensional de HCB-3D na forma de hidrogel natural. (b) fotografia do compósito de HCB-HAp na forma de hidrogel natural. (c) micrografia do MEV da superfície de HCB-3D, ampliação de 16000×. (d) micrografia do MEV do compósito HCB-HAp, ampliação de 800×.	103

Figura 7.2 - Micrografias de MEV da microestrutura do compósito HCB-HAp.
(a) Micrografia da superfície, ampliação 100×. (b), (c), (d), (e) e (f)
Micrografias da fratura com detalhes das multicamadas com hidroxiapatita
depositada nas fibras, com ampliações de 50×, 200×, 800×, 800× e 3200×..... 104

Figura 7.3 - Análise dos compostos químicos da estrutura HCB-HAp por
espectrometria de energia dispersiva (EDS)..... 105

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Propriedade da celulose bacteriana.....	36
Tabela 4.1 – Quantidade de hidrogel de celulose, celulose seca e o conteúdo de água no hidrogel produzido por <i>G. hansenii</i> durante 14 dias em agitador orbital, 2,5 Hz, em 13 ml de meio de cultivo. Ensaio realizado em triplicata.	53
Tabela 4.2 – Produção de celulose e consumo do manitol em função da velocidade de agitação. Ensaio realizado em triplicata.....	56
Tabela 6.1 – Massa úmida, massa seca e conteúdo de água do composto HCB-ACE, utilizando diferentes concentrações de acemanana. Ensaio realizado em triplicata.....	88
Tabela 6.2 – Atribuições das principais absorções de bandas de infravermelho nas amostras HCB-3D e HCB-ACE.....	95

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Descrição da abreviatura
ADP	- adenosina difosfato
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	- adenosina trifosfato
<i>bcs</i>	- <u>b</u> acterial <u>c</u> ellulose <u>s</u> ynthesis
CB	- celulose bacteriana
CPS	- contagens por segundo
c-di-GMP	- diguanosina monofosfato cíclica
EAL	- glutamate-alanina-leucina
EC	- <i>enzyme commission</i>
FAD	- flavina-adenina-dinucleotídeo
FADH	- flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida
FTIR	- espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier
G1P	- glicose-1-fosfato
G6P	- glicose-6-fosfato
GGDEF	- glicina-glicina-aspartato-glutamato-fenilalanina
GMP	- guanosina monofosfato
GTP	- guanosina trifosfato
HCB	- hidrogel de celulose bacteriana
HCB-M	- membrana de hidrogel de celulose bacteriana
HCB-3D	- hidrogel tridimensional de celulose bacteriana
HCB-3D-ACE	- composto hidrogel de celulose bacteriana e acemanana

HCB-HAp	-	compósito multicamada hidrogel de celulose bacteriana e hidroxiapatita
MEV	-	microscopia eletrônica de varredura
NADP	-	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
NADPH	-	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
PAS	-	Per (<i>period clock protein</i>)- Arnt (<i>aryl hydrocarbon receptor protein</i>)- Sim (<i>single-minded protein</i>)
PdeA	-	fosfodiesterase A
PdeB	-	fosfodiesterase B
ppi	-	poros por polegada linear
PPi	-	pirofosfato
pppGpG	-	fosfato-fosfato-fosfato-guanosina-fosfato-guanosina
pGpG	-	fosfato-guanosina-fosfato-guanosina
QH	-	quitosana-hidroxiapatita
UDP	-	uridina difosfato
UDP-glicose	-	uridina difosfato glicose
UTP	-	uridina trifosfato

Resumo

Membranas porosas constituídas de nanofibras de celulose bacteriana foram produzidas pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, quando cultivada em um meio de cultura apropriado e sob circunstâncias estáticas. A formação *in situ* dos poros foi desenvolvida com o uso de moldes adequados. As propriedades físico-químicas da membrana de celulose bacteriana, tais como o grau de cristalinidade e a deformação à tração não foram alteradas significativamente após a formação dos poros. Sugere-se que as membranas assim constituídas de microporos podem ser úteis para aplicações de engenharia de tecidos, que exigem elevadas taxas de oxigenação ou que exigem atraso da contração tecidual. Estruturas tridimensionais em forma de hidrogel de celulose bacteriana foram produzidas utilizando a bactéria *G. hansenii* em culturas sob condições agitadas e meio de cultivo apropriado. Estas estruturas, com geometria esferóide, elipsóide ou ovóide, são compostas por uma massa gelatinosa, em forma de “cocoon”, envolvida por uma membrana densa. Hidrogéis macroscópicos tridimensionais vascularizados de celulose bacteriana foram desenvolvidos através das condições previamente descritas, utilizando-se moldes para a formação de vasos. A massa gelatinosa está envolvida por uma membrana elástica. No seu interior foram produzidos canais que podem simular vasos sanguíneos. Um compósito constituído de celulose bacteriana e acemanana foi preparado através do cultivo da bactéria *G. hansenii* em meio de cultivo suplementado com acemanana, um polissacarídeo proveniente da planta *Aloe barbadensis* Miller. Esse compósito também apresenta uma estrutura tridimensional gelatinosa, composta por nanofibras de celulose e acemanana dispersas aleatoriamente, envolvido por uma densa membrana externa. O grande diferencial deste biomaterial é a incorporação da acemanana nas nanofibras de celulose, com possíveis benefícios terapêuticos da acemanana. A estrutura química da celulose favorece a síntese de hidroxiapatita na sua superfície, transformando-a num biomaterial com propriedades possíveis de promover a recuperação de tecidos ósseos e cartilagosos. Uma estrutura hidrogel tridimensional multicamada composta de celulose bacteriana e hidroxiapatita foi produzida através de mineralização de hidroxiapatita na superfície das nanofibras de celulose. Foi observado que a hidroxiapatita foi depositada na superfície e está homoganeamente distribuída nas nanofibras de celulose. Os estudos reportados neste trabalho ampliam o potencial de aplicação da celulose bacteriana, sobretudo de biomateriais derivados da plataforma tridimensional obtida em culturas hidrodinamicamente controladas.

Palavras-chave: *Gluconacetobacter hansenii*, biopolímero, celulose bacteriana, acemanana, hidroxiapatita, engenharia de tecidos.

Abstract

Porous, nanofibrous bacterial cellulose membranes were produced by the bacterium *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. The bacterium was cultivated in an appropriate culture medium under static conditions. *In situ* pore formation was attained through the use of adequate pin templates. Physico-chemical properties of BC membranes, like degree of crystallinity, swelling and tensile strength were not significantly altered after pore formation. Microporous membranes could be useful for applications in repairing tissues, which require high oxygenation rates or wound contracture delay. Three-dimensional bacterial cellulose hydrogels were produced using the bacterium *G. hansenii* in agitated appropriate culture. The structures exhibit a rough ellipsoid geometry and are composed by a gelatinous mass involved by a denser membrane, which resembles a “cocoon”. Macroscopic vascular three-dimensional bacterial cellulose hydrogels were produced by the same conditions previously described, using appropriate templates for vessels formation. The vessels, that simulate blood vessels, were formed in the inner part of the hydrogel. Three-dimensional bacterial cellulose hydrogels acemannan composite material was produced by supplementing the culture medium with acemannan, which is a polysaccharide extracted from *Aloe barbadensis* Miller. The composite exhibits a three-dimensional hydrogel structure composed of cellulose and acemannan fibers bonded together, random dispersed in the gel and enclosed by a dense external membrane. This new biomaterial is a potential candidate for medical applications due to the therapeutic properties of acemannan. The chemical structure of the cellulose nanofibers favors the nucleation of hydroxyapatite on their surface, which indicates the potential of cellulose-hydroxyapatite composites for applications in tissue engineering for cartilaginous and bone tissue regeneration. A three-dimensional multilayer structure comprised of bacterial cellulose and hydroxyapatite was produced through mineralization of hydroxyapatite on the surface of the cellulose nanofibers. The hydroxyapatite particles were deposited and homogeneously distributed over the surface of the fibers. The studies reported in this work extend the potential of bacterial cellulose, especially of biomaterials derived from the three-dimensional bacterial cellulose based platform obtained with hydrodynamically controlled cultures.

Keywords: *Gluconacetobacter hansenii*, biopolymer, bacterial cellulose, acemannan, hydroxyapatite, Tissue Engineering.

Capítulo 1

**Introdução, Motivação, Justificativa e
Objetivos**

1.1 Introdução, motivação e justificativa

A celulose é um polímero formado por cadeia linear não ramificada de moléculas de glicose unidas por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas. A celulose forma a base estrutural da parede celular de plantas, e também é produzida por outros organismos como algas, fungos e algumas bactérias (Brown *et al.*, 1976; Ross *et al.*, 1991).

A celulose produzida por bactérias possui a mesma estrutura química da celulose produzida por plantas, porém é morfologicamente diferente. Enquanto a celulose sintetizada por plantas necessita de processos de purificação complexos, dispendiosos e altamente poluentes para a extração da lignina e da hemicelulose, o processo de obtenção e de purificação de celulose bacteriana (CB) é bastante simples (Brown *et al.*, 1996).

A CB possui propriedades físicas e mecânicas únicas, não apresentadas por outros biomateriais (Ross *et al.*, 1991; Lillard *et al.*, 1999). Ela é altamente pura, uniforme, biocompatível, o que são propriedades apropriadas para a obtenção de novos biomateriais. Além disso, ela possui grande capacidade de retenção de líquidos, propriedade importante para aplicações médicas e de engenharia de tecidos (Palsson e Bhatia, 2003). A estrutura da CB consiste em uma rede de nanofibras interligadas por ligações de hidrogênio (Brown *et al.*, 1976; Yamanaka, S. *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1998; Yamanaka *et al.*, 2000).

Inicialmente, a produção de celulose por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* foi vista como uma forma de estudar as vias metabólicas de biossíntese deste biopolímero e extrapolá-las para o processo em plantas. Contudo, o desenvolvimento de processos de produção de CB tomou novos caminhos. A CB obtida por essas bactérias tem sido produzida industrialmente e utilizada em diversas aplicações, desde membranas para aparelhos de áudio de

alta qualidade até materiais para a área biomédica, como adjuvante em tratamento de lesões da pele (Fontana *et al.*, 1990; Siqueira e Moreschi, 2000). Estudos recentes têm explorado novas aplicações como, por exemplo, a produção de pequenos vasos sanguíneos (Klemm *et al.*, 2001) e arcabouços (*scaffolds*) para engenharia de tecidos (Svensson *et al.*, 2005).

Os avanços recentes na área de biomateriais e suas aplicações em áreas biomédicas e de engenharia de tecidos mostram o grande potencial de vários polissacarídeos no desenvolvimento de novas classes de materiais médicos. A CB pertence a uma das classes mais promissoras desses biopolímeros. Entretanto, seu potencial para transformação em produto de alto valor biotecnológico ainda não foi completamente explorado (Saxena e Brown, 2005; Czaja *et al.*, 2006; Czaja *et al.*, 2007).

Outros materiais promissores são o alginato, a quitosana, o ácido polilático (PLA). A opção por CB foi motivada pelo seu potencial como biomaterial para a regeneração de pele e potencial para outras aplicações de engenharia de tecidos.

A engenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm, ou melhoram funções celulares ou de um tecido ou de um órgão. Exemplos típicos das aplicações são implantes de polímeros biodegradáveis ou de materiais inertes revestidos com materiais bioativos, que permitem reparo de tecidos a partir de células específicas (Minuth *et al.*, 1998; Rambo *et al.*, 2006). Após a formação de novos tecidos, os materiais poliméricos são, via de regra, continuamente degradados gradualmente em pequenas moléculas, que podem ser absorvidas pelo corpo ou serem expelidas.

A CB é biocompatível, porém possui lenta degradação no corpo humano, devido à ausência de enzimas capazes de romper as ligações químicas entre as moléculas de glicose (Helenius *et al.*, 2006). As estruturas da CB podem ser

modificadas durante a sua síntese adicionando-se ao meio de cultivo substâncias que serão incorporadas nas fibras, por exemplo, a acemanana.

A acemanana é um heteropolímero constituído de mananas acetiladas, proveniente da planta *Aloe barbadensis* Miller. Ela possui diversas propriedades bioativas como, por exemplo, estimulante do sistema imune, ação antiinflamatória e antiviral, e tem sido muito utilizada em produtos comerciais que ajudam na cicatrização de ferimentos (King *et al.*, 1995; Mcanalley *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1998). Além disso, a atividade imunoestimulante da acemanana auxilia na produção de anticorpos e no aumento da expressão de citocinas, implicando no aumento dos fibroblastos em cultura, e no estímulo da atividade fagocítica dos macrófagos (Zhang e Tizard, 1996; Ramamoorthy e Tizard, 1998; Djeraba e Quere, 2000; Lee, J. K. *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 2005).

A criação e investigação de novos produtos biomédicos são de grande interesse para o desenvolvimento de novos tratamentos de saúde e para a melhoria da qualidade de vida. A engenharia química pode contribuir substancialmente para este desenvolvimento na medida em que suas técnicas e métodos são fundamentais para a obtenção em escala laboratorial e industrial desses produtos.

Avanços importantes têm sido realizados na área biomédica como, por exemplo, no uso de material ortopédico e materiais de arcabouço para aplicações de engenharia de tecidos (*scaffolds*). É de interesse científico e tecnológico a busca de propriedades que direcionem a formação de novos tecidos, por exemplo, tecido ósseo e/ou cartilaginoso, em materiais de degradação lenta e/ou controlada. Trabalhos reportando o desenvolvimento de biomateriais compósitos de CB com essas propriedades, tais como celulose bacteriana-glucomanana (Tokoh *et al.*, 1998; Tokoh *et al.*, 2002), e celulose bacteriana-hidroxiapatita (Ekholm *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006; Hutchens *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007) têm tido crescente interesse na literatura.

Além de novas propriedades físico-químicas e biológicas que podem ser obtidas pela combinação de diferentes monômeros e compostos como a hidroxiapatita e a acemanana, as aplicações de engenharia de tecidos e da área biomédica em geral beneficiam-se das propriedades estruturais e morfológicas que dependem do regime hidrodinâmico (cultura estática *versus* cultura agitada) e dos diferentes substratos utilizados como fonte de carbono no processo de biossíntese, como será demonstrado neste trabalho.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de novos biomateriais, baseados em celulose bacteriana, visando sua aplicação na engenharia de tecidos moles e duros.

1.2.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de membranas de celulose bacteriana utilizando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 com padrões pré-definidos de poros produzidos *in situ*;
- Produção de estruturas tridimensionais de celulose bacteriana em agitador orbital utilizando a bactéria *G. hansenii*;
- Obtenção de estruturas tridimensionais de celulose bacteriana com padrões vasculares pré-definidos produzidos *in situ* utilizando a bactéria *G. hansenii*;
- Incorporação de acemanana nas estruturas e fibras de celulose bacteriana;

- Incorporação de hidroxiapatita nos corpos tridimensionais de celulose bacteriana;
- Caracterização dos biomateriais produzidos.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 Celulose bacteriana

2.1.1 Breve histórico

O primeiro estudo documentado relacionado à produção de celulose por bactéria foi relatado em 1886 por Adrian Brown. Ele observou um material gelatinoso que se formava na superfície de uma fermentação de vinagre. A análise desse material revelou que se tratava de celulose. A bactéria produtora de celulose foi denominada *Acetobacter xylinum* (Brown, 1886). Estudo filogenético desenvolvido por Yamada e Hoshino (1997) reclassificou a bactéria *A. xylinum* (= *A. acetii* ssp. *xylinum*, *A. xylinus*) incluindo-a no novo gênero *Gluconacetobacter*, como *Gluconacetobacter xylinus*. Também foram incluídas nesse gênero outras espécies, como: *G. hansenii*, *G. europaeus*, *G. oboediens* e *G. intermedius*. A bactéria *A. xylinum* ATCC 23769, utilizada neste estudo, foi reclassificada como *Gluconacetobacter hansenii* (Yamada *et al.*, 1997). *G. hansenii* é uma bactéria Gram-negativa, estritamente aeróbica, conhecida por produzir celulose na forma de uma película na interface líquido-ar do meio de cultivo, em cultura estática (Dudman, 1960; Ross *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1998).

Entre os anos de 1940 a 1960, pesquisadores da *Hebrew University* em Jerusalém investigaram intensamente a bioquímica da produção de celulose por *G. xylinus*. Eles publicaram quatro artigos detalhando métodos simplificados para produção e quantificação da celulose produzida por *G. xylinus*. Esses métodos são amplamente utilizados nos dias atuais (Hestrin e Schramm, 1954; Schramm e Hestrin, 1954b; Gromet *et al.*, 1957; Schramm *et al.*, 1957).

A nata de coco, um produto alimentício de natureza celulósica, tradicional das Filipinas, é sintetizada por bactérias da flora da água de coco, em especial *G. xylinus*. Esse alimento é manufaturado em forma de uma sobremesa gelatinosa,

que é conservada em calda e freqüentemente servida com frutas, bebidas, cremes ou sorvetes (Lillard *et al.*, 1999).

2.1.2 Estrutura química da celulose bacteriana

A celulose, principal componente da parede celular de plantas, é um polissacarídeo formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de β -D-glicose, unidas por ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas. Cada resíduo de glicose está rotacionado aproximadamente 180° em relação ao resíduo vizinho. A unidade estrutural de repetição da molécula de celulose é a celobiose, formada pela união de duas moléculas de glicose. A cadeia glicana pode ter de 2000 a mais de 25000 resíduos de glicoses. A hidrólise total da celulose produz moléculas de glicose, enquanto que a hidrólise parcial produz moléculas de celobiose (Brown *et al.*, 1996; Raven *et al.*, 2001).

Na natureza, a celulose não existe como uma única cadeia. As moléculas longas e rígidas de celulose combinam-se para formar microfibrilas, cada uma consistindo de várias cadeias de celulose. Essas cadeias, que compõem a microfibrila, estão orientadas paralelamente, formando ligações de hidrogênio intermolecular (entre unidades de glicose de moléculas de celulose adjacentes) e intramolecular (entre unidades de glicose da mesma molécula de celulose) (Raven *et al.*, 2001). A Figura 2.1, mostra a estrutura da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana denominada celulose e as ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular.

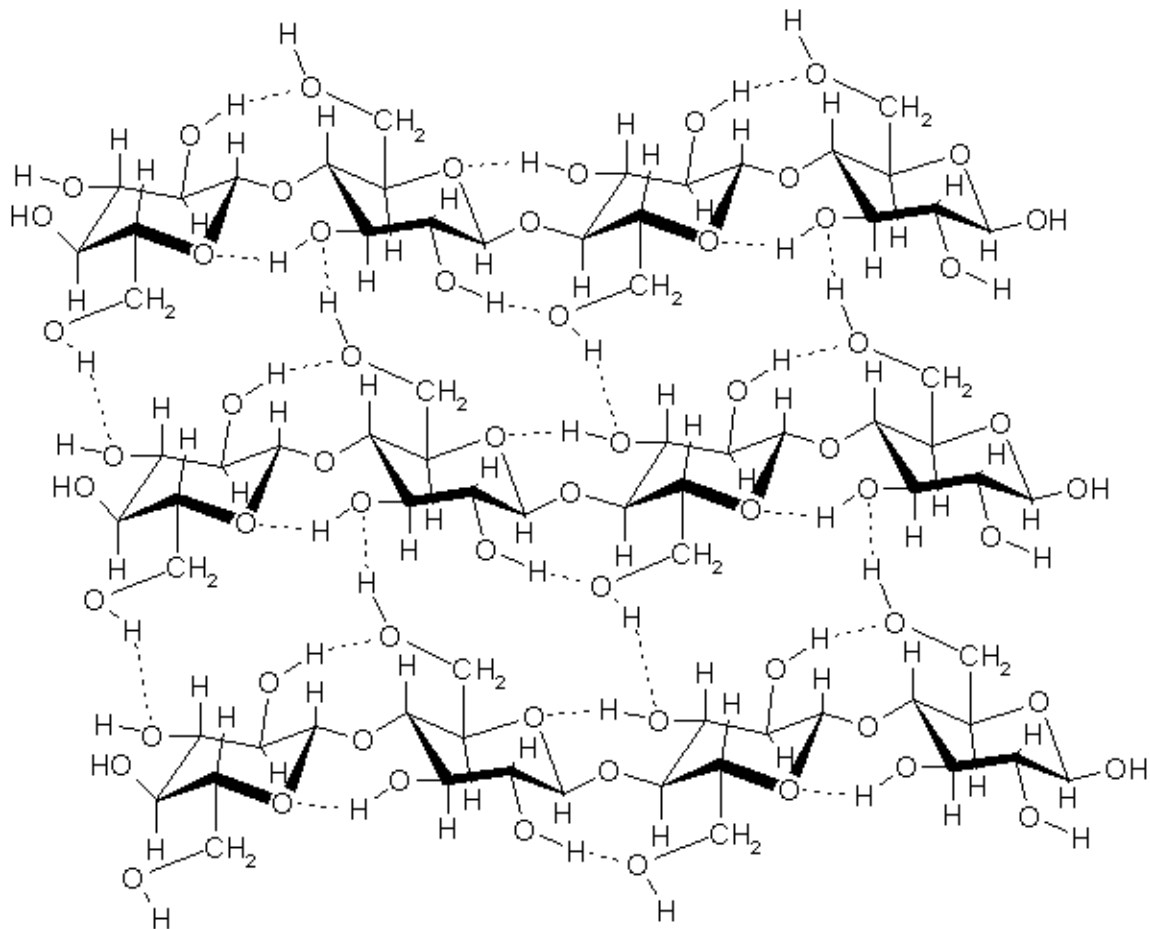


Figura 2.1 - Estrutura química da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana (celulose), mostrando as ligações de hidrogênio intra e inter cadeias de celulose. Adaptado de www.sameerrahatekar.org/Cellulose_Silk_IL.html, acessado em 25/09/2008.

Entre as seis formas conhecidas de celulose (I, II, III₁, III₁₁, IV₁ e IV₁₁) duas formas cristalinas comuns são de interesse: celulose I e II (O'sullivan, 1997). Sabe-se que na celulose I, que é sintetizada por plantas e também pela bactéria *G. xylinus* em cultura estática, as cadeias paralelas de $\beta(1\rightarrow4)$ -glicanas estão dispostas uniaxialmente; já na celulose tipo II, as cadeias estão arranjadas aleatoriamente. Além disso, a celulose cristalina tipo I apresenta duas formas distintas: I _{α} e I _{β} , que consistem de uma cadeia tricíclica e uma cadeia monocíclica, respectivamente, que são difíceis de distinguir por difração de raios X (O'sullivan, 1997), mais podem ser evidenciadas por análise de infravermelho. A celulose sintetizada por *G.*

xylinus em culturas estáticas é geralmente composta por celulose I_α (Tokoh *et al.*, 1998; Schenzel *et al.*, 2005).

A microfibrila de CB tem aproximadamente 36 cadeias de celulose, sendo que a celulose produzida por algas pode formar microfibrilas com mais de 1200 cadeias β(1→4)-glicana. A estrutura da celulose tem sido identificada através de microscopia eletrônica em membranas celulares de vários organismos. Complexos arranjados linearmente em uma única fileira ou múltiplas fileiras são observados em bactérias, enquanto que em plantas é observada uma estrutura sextavada denominada roseta (Delmer, 1999).

A estrutura da celulose produzida por algas, fungos e algumas bactérias possui a mesma estrutura química da celulose produzida por plantas, porém com propriedades físicas e mecânicas únicas não apresentadas por outros biomateriais (Brown, 1886; Ross *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1996).

2.1.3 *Biossíntese de celulose bacteriana*

A bactéria *G. xylinus* tem a capacidade de utilizar uma variedade de substratos carbônicos para a biossíntese de celulose. A via bioquímica mais compreendida envolve a conversão da glicose como substrato exógeno à celulose. A Figura 2.2 apresenta a via de biossíntese de celulose em *G. xylinus*, adaptado da proposta de Ross e colaboradores (1991). Nessa via participam algumas enzimas individuais envolvendo várias reações, onde a glicose é primeiramente fosforilada para glicose-6-fosfato (G6P) pela enzima glicocinase com a participação de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) e liberada uma molécula de adenosina difosfato (ADP); numa segunda reação a G6P é convertida a glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase; G1P, através de uma reação de isomerização catalisada pela enzima UDP-glicose-pirofosforilase é convertida em uridina difosfato glicose (UDP-glicose), utilizando uma molécula de uridina trifosfato

(UTP) e liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). A molécula de UDP-glicose é, finalmente, utilizada como precursora da biossíntese da celulose.

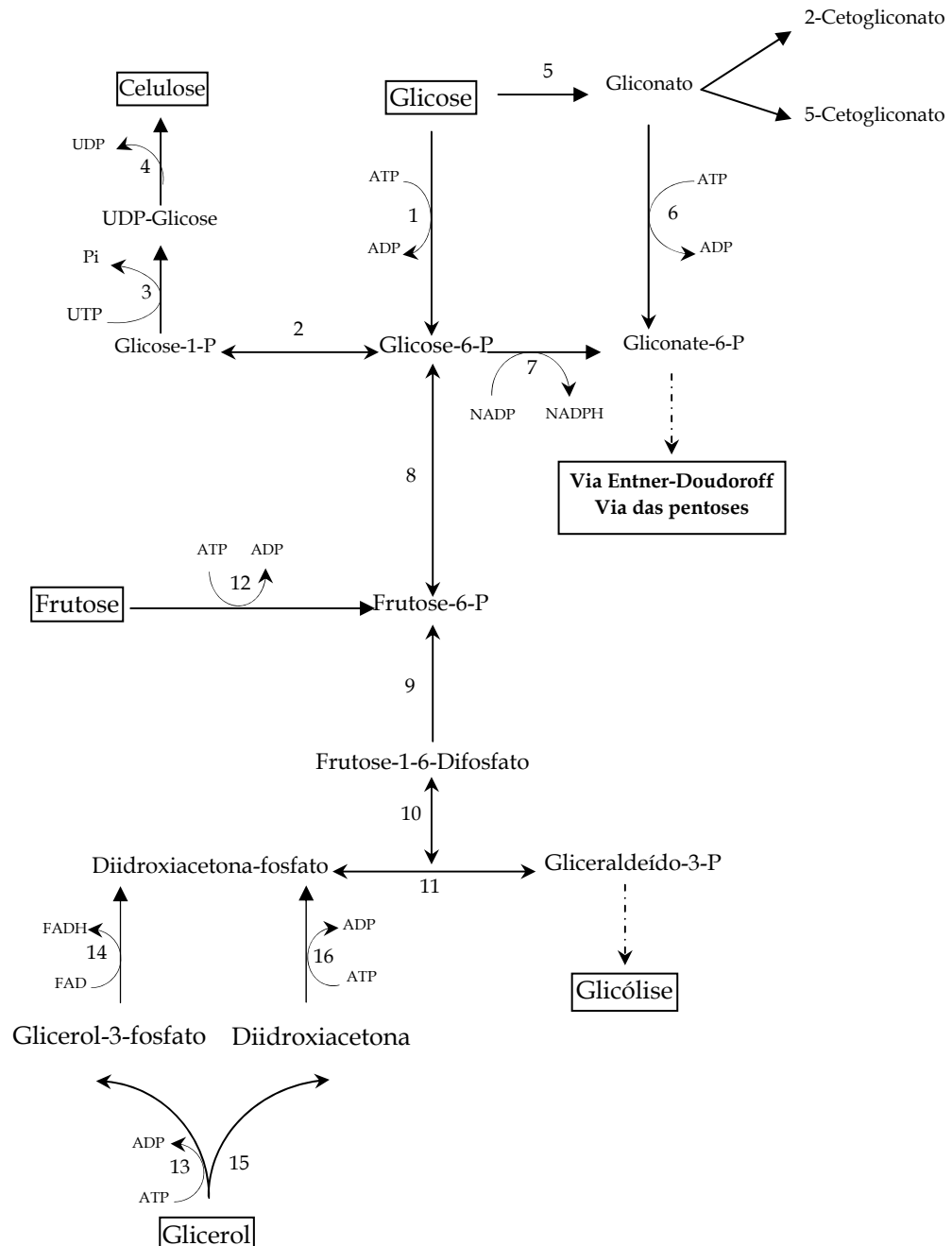


Figura 2.2 - Via de biossíntese de celulose por *Gluconacetobacter xylinus*, adaptado de Ross e colaboradores (1991). Enzimas: (1) glicoquinase; (2) fosfoglicomutase; (3) UDP-glicose-pirofosforilase; (4) celulose sintase; (5) glicose oxidase; (6) gliconoquinase; (7) glicose-6-fosfato desidrogenase; (8) fosfoglicoisomerase; (9) frutose bisfosfatase; (10) frutose-1,6-bisfosfato aldolase; (11) triose fosfato isomerase; (12) frutoquinase; (13) glicerol quinase; (14) glicerol-3-fosfato desidrogenase; (15) glicerol oxidase; (16) diidroxiacetona quinase.

A polimerização de glicose em cadeias $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana envolve um complexo enzimático presente na membrana celular, cujos genes que codificam as proteínas e enzimas desse complexo estão organizados em um operon denominado *bcs* (*bacterial cellulose synthesis*) (Recouvreux, 2004). Em *G. xylinus*, esse operon codifica proteínas e enzimas (*bcsA*, *bcsB*, *bcsC* e *bcsD*) que compõem uma associação para a polimerização da glicose e a formação de celulose (Wong *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1991; Saxena *et al.*, 1994). A inativação dos genes *bcsA*, *bcsB* e *bcsC* conduz à perda da capacidade de produzir celulose. Já, a inativação do gene *bcsD* conduz somente a uma redução de 40% da produtividade de celulose (Saxena *et al.*, 1994). Isso indica que o gene *bcsD* está envolvido na produção de celulose em *G. xylinus*. A enzima celulose sintase codificada pelo gene *bcsA* é, efetivamente, responsável pela polimerização da cadeia de celulose, sendo o seu substrato a molécula UDP-glicose. O operon *bcs* é conservado entre várias espécies de bactérias Gram-negativas (Römling, 2002).

2.1.4 Regulação da biossíntese de celulose bacteriana

A enzima celulose sintase em *G. xylinus* é ativada alostericamente pela molécula diguanosina monofosfato cíclica (c-di-GMP). A

Figura 2.3 mostra o modelo de regulação alostérica da síntese de celulose por *G. hansenii* proposto por Ross e colaboradores (1987). O ativador c-di-GMP é sintetizado pela enzima diguanilato ciclase a partir de duas moléculas de guanosina trifosfato (GTP). A concentração de c-di-GMP intracelular é controlada pela ação oposta da enzima fosfodiesterase que degrada a molécula ativadora c-di-GMP (Ross *et al.*, 1987; Ross *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1991). Os genes que codificam as enzimas que sintetizam e degradam c-di-GMP em *G. xylinus* estão organizados em um operon contendo três diguanilato ciclase e três fosfodiesterase (Chang *et al.*, 2001). Tanto a diguanilato ciclase como a fosfodiesterase possuem em sua estrutura primária o domínio GGDEF (Figura 2.4). Tem sido demonstrado que

proteínas que possuem o domínio GGDEF possuem atividade diguanilato ciclase (Ausmees *et al.*, 2001; Galperin *et al.*, 2001; Pei e Grishin, 2001; Paul *et al.*, 2004; Galperin, 2005).

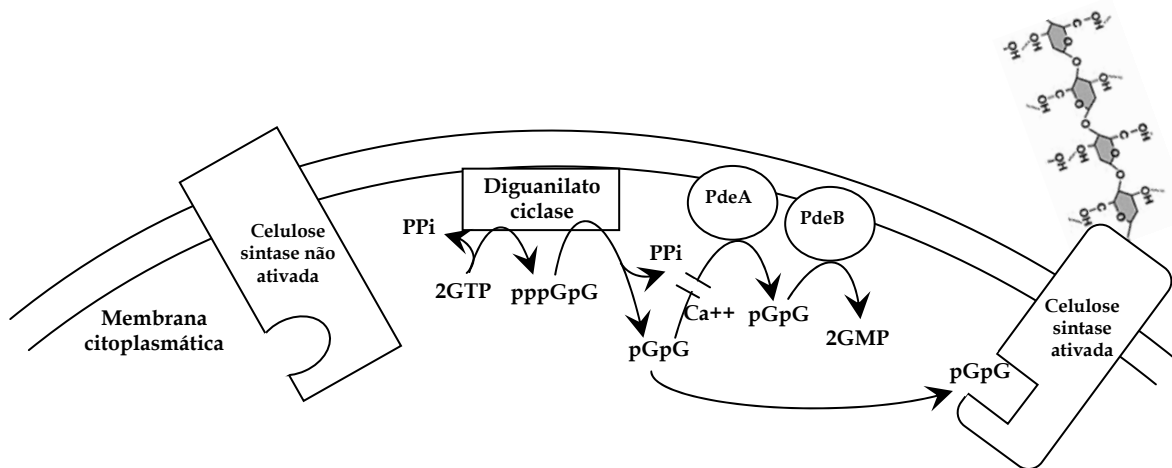


Figura 2.3 - Modelo da regulação de síntese de celulose bacteriana adaptado de Ross e colaboradores (1987).

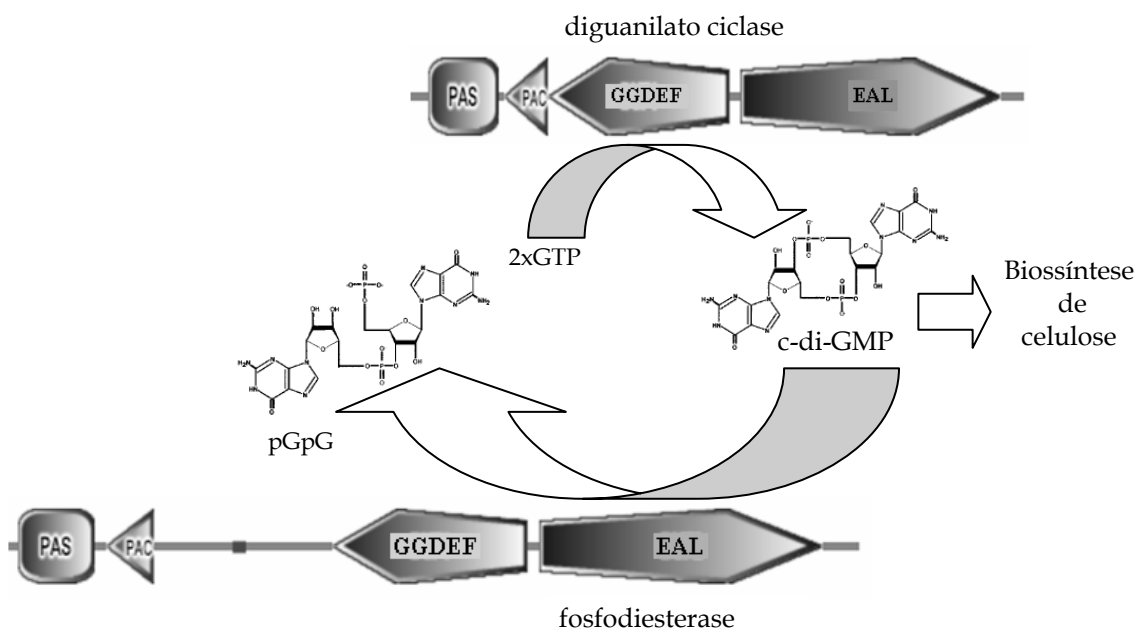


Figura 2.4 - Controle do nível celular de c-di-GMP pelas enzimas diguanilato ciclase e fosfodiesterase em *G. hansenii*.

2.1.5 *Produção de celulose bacteriana*

A produção de celulose pode ser desenvolvida de três diferentes formas, dependendo do regime hidrodinâmico que se deseja imprimir: cultivos em culturas estáticas, cultivos em culturas agitadas em agitador orbital ou cultivos em culturas agitadas em biorreator.

2.1.5.1 *Cultura estática*

Tradicionalmente a celulose bacteriana é produzida em culturas estáticas utilizando a bactéria *G. xylinus*, que produz uma película de celulose na superfície do meio de cultivo. O método de produção é muito simples, de baixo custo e extensivamente utilizado para a produção de membranas de CB. No modo tradicional, em culturas estáticas, a cultura é desenvolvida em bandejas rasas, permanecendo cobertas por um período de 7 a 20 dias, até que uma película cubra a superfície do meio de cultivo da bandeja. A película é então removida, lavada para eliminar as bactérias, e está pronta para ser processada para a aplicação desejada.

Bungay e Serafica (1997) desenvolveram um biorreator de discos para simular condições estáticas de cultivo de *G. xylinus* para produção de celulose. Os discos giram passando pelo meio de cultivo. As bactérias aderem aos discos, formando um biofilme celulósico na superfície dos discos.

Hestrin e Schramm (1954) conduziram experimentos para estabelecer condições ideais para produção de celulose por *G. xylinus* em culturas estáticas a partir de glicose como fonte de carbono. Eles observaram em microscópio óptico a formação de um fio fino, após uma hora de terem sido inoculadas células de *G. xylinus* numa cultura sob condições estáticas, utilizando 2% glicose, pH 5,0 e temperatura de 37°C. Após duas horas de cultivo foi observada a formação de um gel viscoso na superfície do meio de cultivo. Outras fontes de carbono foram

testadas para produção de celulose (frutose, sacarose, glicerol, manitol, lactose, maltose, sorbitol). As condições ótimas estabelecidas pelos autores foram: 2% de glicose, pH entre 5,0 e 7,0 e temperatura entre 25°C a 37°C (Hestrin e Schramm, 1954). Essas condições de cultivo têm sido amplamente utilizadas até os dias atuais.

Borzani e De Souza (1995) mostraram que a camada da película que cresce é a que está em contato com ar na superfície do meio de cultura. Portanto, os nutrientes difundem pelas camadas de celulose já produzidas até as células produtoras de celulose.

Embora a produção de celulose bacteriana em culturas estáticas seja muito simples, existem inconvenientes que impedem o controle de parâmetros para melhorar o rendimento. Como a película é formada na superfície do meio de cultivo, movimentações e interferências para que se possam coletar medidas podem influenciar no crescimento. Dessa forma é difícil o controle do pH, do crescimento celular, e da adição de reagentes durante o cultivo, e sabe-se que esses parâmetros são importantes para determinar condições ótimas de produtividade. Portanto, a produção de celulose em culturas estáticas não é apropriada para produção em escala comercial.

2.1.5.2 Cultura agitada (agitador orbital)

Visando maximizar a produção de celulose, sistemas agitados têm sido estudados. Para a determinação de um meio quimicamente definido para cultivos sob agitação e determinação de parâmetros ótimos, inicialmente as culturas são desenvolvidas em frascos Erlenmeyer, em agitador orbital. Posteriormente, o cultivo é transferido para biorreatores.

Experimentos desenvolvidos por Schramm e Hestrin (1954a) mostraram que, ao contrário do cultivo em condições estáticas, o volume do meio de cultivo em condições agitadas influencia no rendimento. No entanto, o rendimento obtido do

cultivo em agitador orbital foi consideravelmente menor do que o cultivo obtido sob condições estáticas. A celulose produzida em agitador orbital formou corpos de aproximadamente 10 mm de diâmetro com diferentes formatos (esféricos, estrelados e filamentosos).

Um dos grandes problemas de sistema para produção de celulose em culturas agitadas refere-se a mutações espontâneas. Bactérias produtoras de celulose quando são transferidas para culturas agitadas espontaneamente se transformam em linhagens não produtoras de celulose, implicando no aumento da densidade celular, resultando, porém, em baixo rendimento de celulose.

Meios de cultivo quimicamente definidos para produção de celulose em agitador orbital por *G. xylinus* têm sido também bastante investigados. Observou-se que a adição de etanol ao meio de cultivo proporciona melhor rendimento e evita a mutação de bactérias produtoras de celulose para bactérias não produtoras de celulose. O rendimento máximo tem sido maior que o obtido com meio convencional Hestrin e Schramm (Son *et al.*, 2001; Heo e Son, 2002).

2.1.6 Propriedades da celulose bacteriana

A CB sintetizada por bactérias do gênero *Gluconacetobacter* possui propriedades peculiares não encontradas na celulose vegetal. Ela é altamente pura (livre de lignina e hemicelulose), hidrofílica (grande capacidade de absorver e reter água ou líquidos orgânicos – cerca de 98% a 99% do seu volume total é composto de líquidos), altamente resistente quando úmida, cristalina, estrutura regular composta por nano e microfibras, biocompatível, não alergênica, não tóxica, boas propriedades mecânicas (alta força de tensão e elasticidade) e grande durabilidade (Yamanaka, S. *et al.*, 1989; Fontana *et al.*, 1990; Brown Jr., 1999; Krystynowicz *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 2005).

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 (Haigler *et al.*, 1982; Brown *et al.*, 1983; Ogawa e Tokura, 1992; Oikawa *et al.*, 1995; Yamanaka *et al.*, 2000; Lee, J. W. *et al.*, 2001; Ciechańska, 2004). Esse fato tem conduzido pesquisadores a encontrar uma variedade de aplicações para esse biomaterial.

2.1.7 Aplicações da celulose bacteriana

A aplicabilidade da CB é muita extensa. Na indústria alimentícia ela é utilizada na produção de nata de coco, sorvetes de baixas calorias, aperitivos, doces, espessante e soro para redução do colesterol (Brown Jr., 1998a). Na indústria de cosméticos a CB é utilizada como hidratantes e adstringentes. Em empresas de aparelhos eletroacústicos ela é utilizada como membrana para aparelhos de áudio de alta qualidade. A CB é utilizada ainda para membrana para célula combustível (hidrogênio); aditivo para papel de alta qualidade; papel eletrônico (*e-paper*); membrana de ultrafiltração (purificação da água) e membrana para recuperação de óleo e mineral (Brown Jr., 1998a).

Nos últimos anos a CB tem despertado grande interesse como biomaterial para uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo substituto temporário da pele para recuperação de ferimentos e queimaduras; sistema para liberação de fármacos; produção de vasos sanguíneos; recuperação de nervos; recuperação da gengiva; recuperação da dura-máter; arcabouços (*scaffold*) para engenharia de tecidos; revestimento de *stents* e material de regeneração óssea (Fontana *et al.*, 1990; Mello *et al.*, 2001; Svensson *et al.*, 2005; Czaja *et al.*, 2006; Czaja *et al.*, 2007; Mello *et al.*, 1997; Ereno, 2004; Negrão *et al.*, 2006). A Figura 2.5 mostra algumas aplicações da CB na área biomédica.

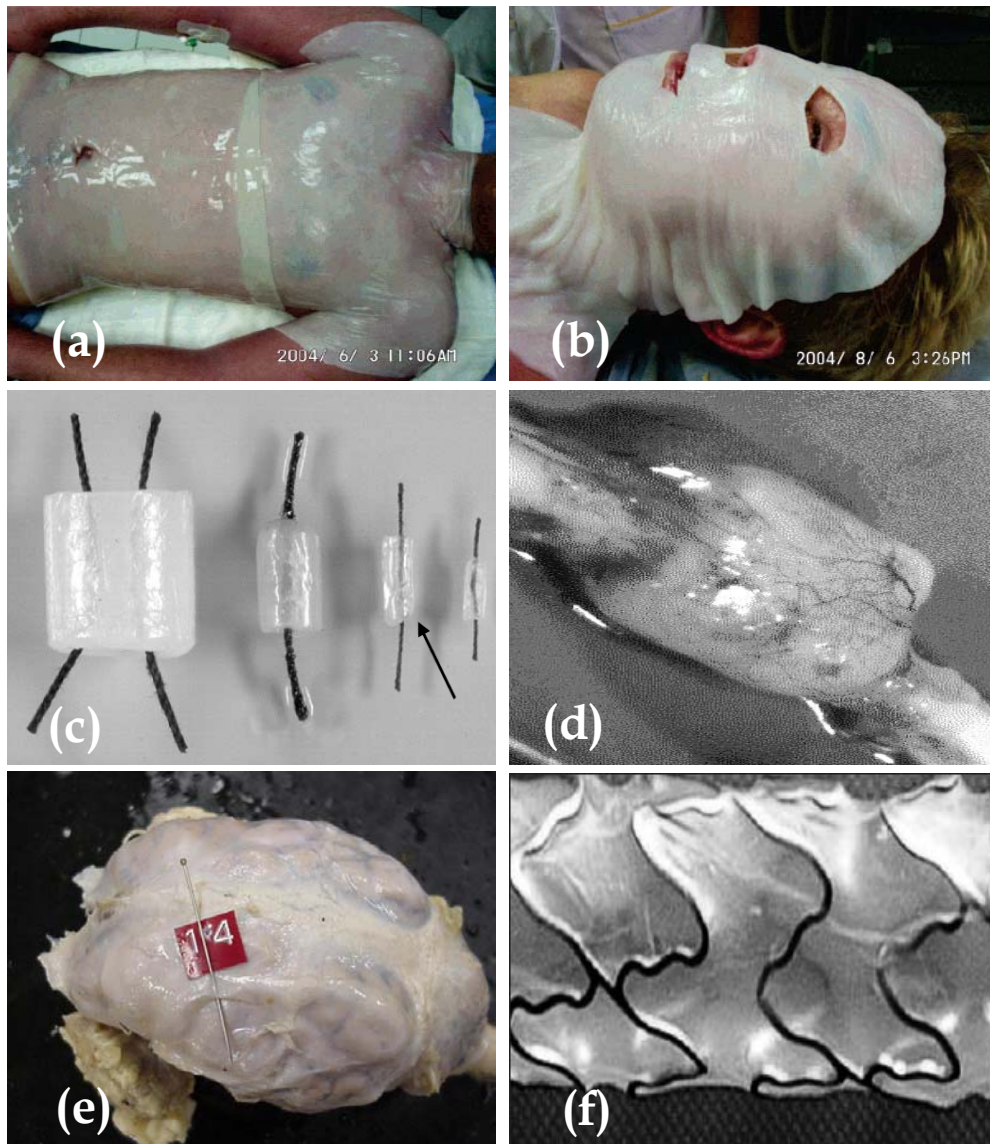


Figura 2.5 - Aplicações da celulose bacteriana na área biomédica. (a) e (b) substituto de pele (Czaja *et al.*, 2007); (c) e (d) vasos sanguíneos (Klemm *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 2006); (e) recuperação da dura-máter (Mello *et al.*, 1997; Mello *et al.*, 2001) e (f) como revestimento de *stents* (Negrão *et al.*, 2006).

2.2 Acemanana

A planta *Aloe vera* (recentemente renomeada de *A. barbadensis* Miller), popularmente conhecida como babosa, é largamente utilizada na medicina

popular, principalmente pela indústria de cosméticos (Araújo *et al.*, 1999). Entre os compostos químicos da *A. barbadensis* estão polissacarídeos, antraquinonas, esteróides, vitaminas, enzimas entre outros compostos. As glucomananas são os principais polissacarídeos, com destaque para a acemanana, a parte majoritária e mais estudada (Campestrini, 2007).

A acemanana é um heteropolímero constituído de mananas acetiladas, com cadeias de tamanhos variáveis, formadas por resíduos de manose e glicose unidos por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e massa molecular de aproximadamente 1000 KDa (Femenia *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2004). A Figura 2.6 mostra a estrutura química da acemanana. A denominação acemanana deve-se ao fato de um grupamento acetil ligado a cada manose (Diehl e Teichmuller, 1998; Femenia *et al.*, 1999).

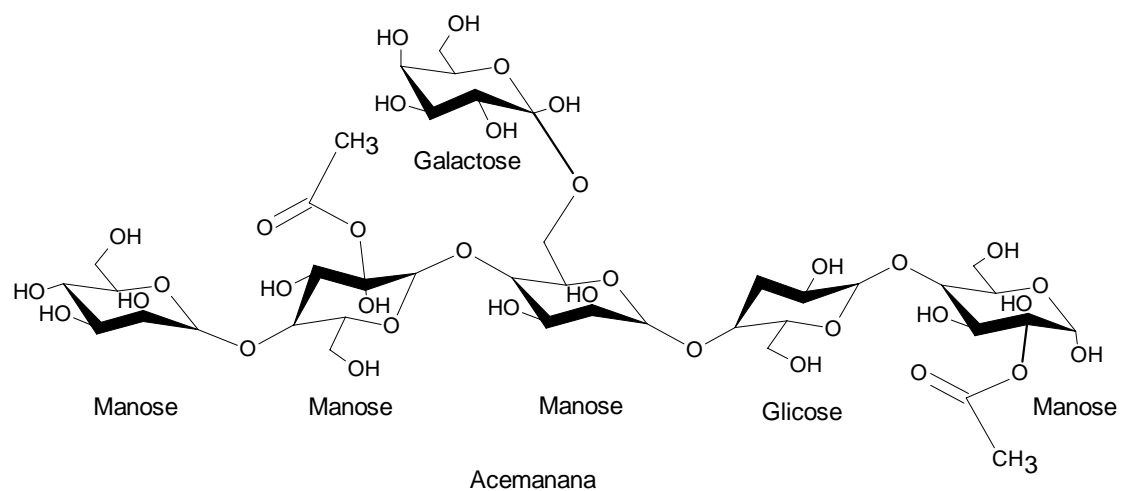


Figura 2.6 – Estrutura química da acemanana.

Diversas pesquisas têm demonstrado as propriedades medicinais da *A. barbadensis*, tais como, ações imunoestimulantes, antiinflamatória e antiviral. Atenção maior tem-se dedicado a fração polissacarídica, em especial à acemanana que tem sido utilizada em produtos comerciais que ajudam na cicatrização de lesões, indicados para o tratamento de ferimentos crônicos e úlceras (King *et al.*, 1995; Mcanalley *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1998). Além disso, a acemanana

apresenta atividade imunoestimulante na produção de anticorpos específicos e no aumento da expressão de citocinas, tais como interleucina I (IL-1), interleucina VI (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), implicando no aumento dos fibroblastos em cultura, e no estímulo da atividade fagocítica dos macrófagos (Zhang e Tizard, 1996; Ramamoorthy e Tizard, 1998; Djeraba e Quere, 2000; Lee, J. K. *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 2005).

2.3 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), é o principal mineral constituinte dos ossos e dentes. Estudos sobre o crescimento de cristais sugerem que a nucleação ocorre nas superfícies que expõem padrões repetitivos de grupos aniônicos. Estes grupos aniônicos tendem a concentrar os cátions inorgânicos criando um ambiente supersaturado, promovendo dessa forma a nucleação orientada dos cristais (Hartgerink *et al.*, 2001). A celulose possui na sua cadeia grupos aniônicos OH^- (hidroxilas com cargas negativas) livres que permitem a ligação do Ca^{++} numa solução ácida de CaCl_2 . O fosfato pode então se ligar ao cálcio e formar o fosfato de cálcio (Hutchens *et al.*, 2006).

As doenças ósseas (osteoporose, artrite, artrose, entre outras) representam uma condição séria de saúde que impacta diretamente a qualidade de vida das pessoas, particularmente na velhice. Na maioria dos casos, o tratamento de lesões ósseas requer enxerto ósseo, e às vezes, uma quantidade extensiva. Para esses enxertos, ossos autógenos têm sido utilizados. Entretanto, coletar os ossos autógenos pode danificar o corpo saudável. Além disso, a quantidade que pode ser coletada é muito limitada (Kokubo *et al.*, 2003).

Devido às suas características químicas e estruturais, a hidroxiapatita tem sido muito utilizada na área médica em implantes e próteses como material biocompatível e osteoindutor, que promove o desenvolvimento do tecido ósseo

(Granja *et al.*, 2001). Em especial na ortopedia, a hidroxiapatita é utilizada como revestimento de próteses metálicas para promover a ligação estável entre o material implantado e o tecido (Ekholm *et al.*, 2005).

2.4 Biomateriais baseados em celulose bacteriana para aplicações médicas e de engenharia de tecidos

Os biomateriais são novos materiais projetados para substituir partes do corpo e permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por doenças ou acidentes. Um biomaterial ideal deve possuir as seguintes características: ser biocompatível, biofuncional, bioabsorvível, biodegradável, poroso, permeável para passagem de nutrientes e troca de gases, possuir tamanho de poros que permita a penetração celular e formação de tecido, possuir superfície apropriada para adesão celular, promover produção da matriz extracelular, transportar e transmitir sinais biomoleculares (Palsson e Bhatia, 2003). A biocompatibilidade e biofuncionalidade são as principais características necessárias para que esses materiais exerçam essas funções. A biocompatibilidade é a aceitação do biomaterial pelo corpo; já a biofuncionalidade representa a habilidade do material desempenhar a função desejada.

A engenharia de tecidos 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). O termo engenharia de tecidos é freqüentemente utilizado para descrever terapias celulares que incluem uma compreensão básica da célula e biologia do desenvolvimento, análise e projeto de bioengenharia, e implementação clínica (Palsson e Bhatia, 2003).

A aplicação da CB como material na área biomédica tem atraído muita atenção nos últimos anos, devido a sua estrutura de nanofibras, propriedade

mecânica, elevada capacidade de reter água e biocompatibilidade. Estudos de biocompatibilidade da CB *in vivo*, utilizando modelo animal, têm demonstrado que ocorre a integração da CB com o tecido e que não apresenta processos inflamatórios. A CB, portanto, possui potencial para ser usada como arcabouços na engenharia de tecidos (Svensson *et al.*, 2005).

Capítulo 3

**Membrana Porosa de Celulose
Bacteriana para Aplicações em
Engenharia de Tecidos**

Resumo

Membranas porosas constituídas de nanofibras de celulose bacteriana (CB) foram produzidas utilizando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, quando cultivada em um meio de cultura apropriado e sob circunstâncias estáticas. A formação *in situ* dos poros foi alcançada utilizando pinos como moldes, com diâmetros que variaram de 60 a 300 µm. Os pinos foram construídos a partir de fio de Nylon® ou fibras ópticas e foram imersos diretamente no meio de cultivo. A biossíntese de celulose ocorreu em torno dos pinos produzindo poros na membrana de celulose. Após a remoção do molde, a membrana de CB com poros (CBP) foi purificada e caracterizada. As propriedades físico-químicas da membrana de CB, como o grau de cristalinidade e a deformação à tração não foram alteradas significativamente após a formação dos poros. A avaliação da microestrutura das membranas CBP revelou que a matriz da membrana é composta por longas nanofibras distribuídas isotropicamente na sua superfície. Os poros não apresentaram falhas nas bordas, o que poderia propiciar a propagação de rachaduras ao longo da superfície da membrana. As membranas constituídas de microporos podem ser úteis para aplicações de engenharia de tecidos que exijam elevadas taxas de oxigenação, ou que exijam atraso na migração celular.

3.1 Introdução

A celulose produzida por bactérias tem despertado grande interesse na área biomédica, pois pode ser utilizada como biomaterial na engenharia de tecidos devido às suas propriedades biológicas, físicas e mecânicas. Tem sido utilizada como adjuvante em tratamentos de lesões da pele (Fontana *et al.*, 1990; Siqueira e

Moreschi, 2000), na produção de vasos sanguíneos (Klemm *et al.*, 2001) e em arcabouços para engenharia de tecidos (Svensson *et al.*, 2005).

A estrutura fibrosa da CB, que consiste de uma rede de nanofibras de celulose, é altamente cristalina (Brown *et al.*, 1976; Yamanaka, S *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1998; Yamanaka *et al.*, 2000). O grau de cristalinidade da celulose influencia em algumas propriedades físico-químicas, por exemplo, a hidratação e a resistência a tração (Schenzel *et al.*, 2005). A avaliação de parâmetros que influenciam na biossíntese e na composição polimérica da celulose pode permitir a obtenção de novos polímeros derivados da celulose com estrutura química, morfológica e molecular desejada.

Recentemente foi relatada por Siqueira e colaboradores (2000) a utilização de membranas de CB com poros para tratamentos preventivos e curativos de lesões da pele. Entretanto, essas membranas não são extensivamente usadas em engenharia de tecidos. Elas são constituídas de poros grandes que são geralmente indicadas para o tratamento preventivo e para cicatrização de ferimentos, em especial aqueles em que a exudação e a oxigenação são necessárias (Siqueira e Moreschi, 2000; Siqueira, 2003).

Um caso particular e de grande interesse no uso de membranas porosas é o mecanismo de recuperação de lesões. Nesse mecanismo o diâmetro de poros deve impedir a contractura da lesão e promover a regeneração do tecido pelo próprio organismo. O diâmetro ótimo dos poros para impedir a migração dos fibroblastos encontra-se entre 20 e 120 μm (Palsson e Bhatia, 2003). A Figura 3.1 apresenta as possibilidades de aplicações de CB com poros em função do diâmetro dos poros.

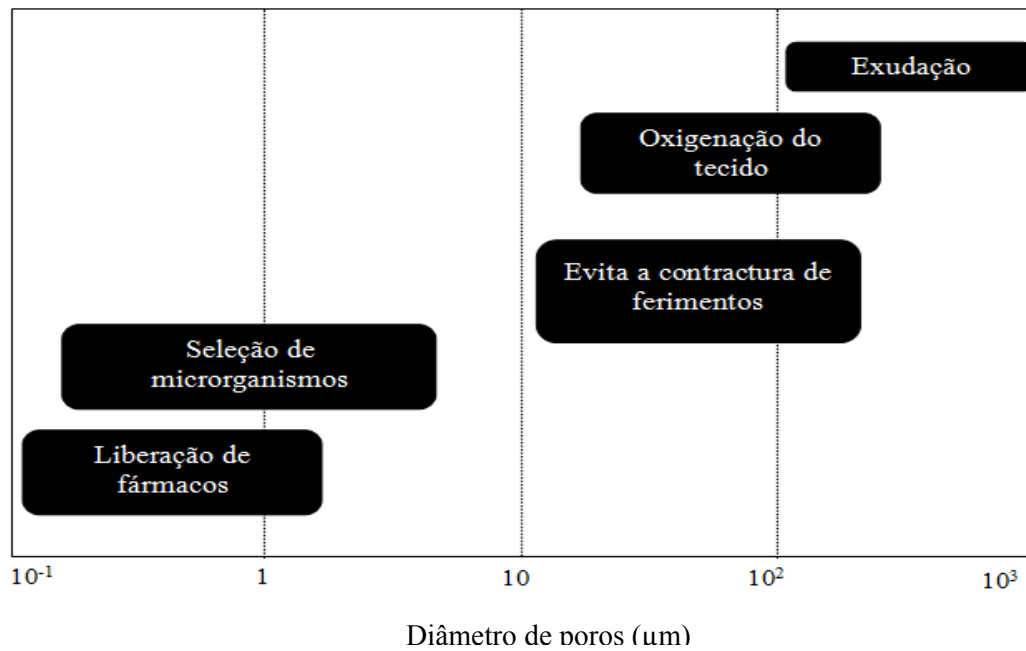


Figura 3.1 – Possibilidades de aplicações da membrana de celulose bacteriana porosa em função do diâmetro dos poros.

Este trabalho teve como objetivo produzir membranas de CB com poros produzidos *in situ*, buscando modificar/melhorar determinadas características da CB tais como porosidade, distribuição de tamanho dos poros, e a geometria dos poros para aplicações específicas.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 *Produção de membranas porosas*

3.2.1.1 *Microrganismo*

A bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, obtida da "Coleção da Cultura Tropical (CCT)" (Fundação André Tosello), Campinas - SP, foi utilizada para a produção de CB.

3.2.1.2 *Preparação do inóculo para os experimentos*

O inóculo foi cultivado em frasco Erlenmeyer de 125 ml contendo 30 ml de meio de cultura com a seguinte composição: manitol (25 g l⁻¹), extrato de levedura (5,0 g l⁻¹) e bactopectona (3,0 g l⁻¹). Os compostos foram diluídos em água; o pH foi ajustado para 6,6 com o auxílio de soluções de HCl e NaOH e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Ao meio de cultivo esterilizado foi adicionado 5% (v/v) de inóculo obtido de uma cultura estoque de *G. hansenii*. Os frascos foram mantidos a 25°C, em condições estáticas, durante 2 dias.

3.2.1.3 *Meio e condições de cultivo*

O cultivo foi realizado em meio Hestrin & Schramm (Hestrin e Schramm, 1954) que possui a seguinte composição: glicose (20 g l⁻¹), peptona (5 g l⁻¹), extrato de levedura (5 g l⁻¹), fosfato bibásico de sódio anidro (2,7 g l⁻¹) e ácido cítrico monohidratado (1,15 g l⁻¹). Os compostos foram diluídos em água; o pH foi ajustado para 6,6 com o auxílio de soluções de HCl e NaOH e foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Ao meio de cultivo esterilizado e resfriado até atingir a temperatura de 30°C foi adicionado 5% (v/v) do inóculo previamente

preparado. O cultivo foi mantido sob condições estáticas, a 30°C, em frascos adaptados com uma estrutura matriz constituída de suportes com pinos de diâmetros pré-determinados, que atuaram como formador de poros durante a síntese da membrana celulósica na superfície do meio de cultivo. Após sete dias de cultivo, a estrutura matriz foi retirada. A membrana em forma de hidrogel separada da superfície líquida do meio de cultivo foi lavada com água submetida ao tratamento de purificação. As amostras foram secas em estufa a 50°C para a caracterização.

3.2.1.4 Purificação da celulose

A purificação consistiu no tratamento da massa gelatinosa com uma solução de NaOH a 0,1 M, a 90°C, por 20 minutos, para remover as impurezas bacterianas e os eventuais restos contaminantes (Watanabe *et al.*, 1998). Após esse tratamento a massa gelatinosa foi lavada com água até atingir pH neutro; e finalmente ela foi lavada com água destilada e armazenada em solução de etanol 20%, a 10°C, para uso futuro.

3.2.2 Caracterização das membranas porosas

3.2.2.1 Microscopia óptica

As observações em Microscópio Óptico (MO) (Trinocular, XDS-1B, 40×) foram realizadas a fim de avaliar a morfologia e a distribuição dos microporos das membranas de CBP.

3.2.2.2 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A microestrutura das amostras foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (Philips, XL-30). Para as observações de MEV, amostras secas foram colocadas sobre um suporte de alumínio e recobertas com ouro.

3.2.2.3 *Difratometria de raios X*

A difração de raios X (XRD, Philips, X'Pert) com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.45$ nm) foi utilizada para identificar as principais fases cristalinas da membrana de celulose. Amostras das membranas CB e CBP secas foram colocadas sobre uma placa de alumínio e medidas com ângulo 2θ em relação à superfície da amostra, num intervalo de 5° a 40° , com variação de $1^\circ\cdot\text{min}^{-1}$. Arquivos JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) foram usados para a identificação das fases. O grau de cristalinidade foi estimado através da razão entre a área sob os picos cristalinos (110) e (200) e a área total, de acordo com o método descrito por Watanabe e colaboradores (1998).

3.2.2.4 *Resistência à tração*

Os ensaios de tração das membranas CB e CBP foram realizados utilizando um conjunto de cinco amostras de cada membrana com dimensões nominais de 70×25 mm (Instron 4202, Instron Corp., Canton, MA). A velocidade do cabeçote foi ajustada constante a $1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. A curva tensão-deformação foi construída utilizando-se o software Origin®, versão 7.0.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Produção da membrana porosa

A membrana de CB produzida pela bactéria *G. hansenii* na superfície do meio de cultura no estado úmido é um gel transparente, homogêneo e altamente resistente. A Figura 3.2 mostra o hidrogel de CB produzido por *G. hansenii* em condições estáticas, durante sete dias. A espessura da membrana seca varia de 150 μm a 200 μm .

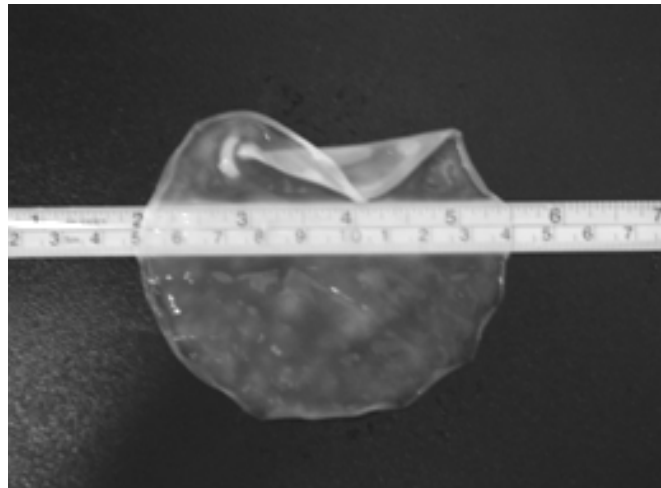


Figura 3.2 – Fotografia da membrana de celulose bacteriana no estado hidratado.

3.3.2 Morfologia da membrana porosa

A análise de MEV da membrana de CB seca (Figura 3.3(a)) revelou que ela é composta de uma matriz densa e homogênea de longas fibras. A Figura 3.3(b) mostra a micrografia de MEV com os detalhes da microestrutura, uma rede entrelaçada de longas nanofibras de celulose com diâmetros médios menores do que 100 nm e elevada razão de aspecto. Não foram visualizadas bactérias na

superfície da membrana, o que indica que o tratamento realizado para purificação da celulose foi eficaz.

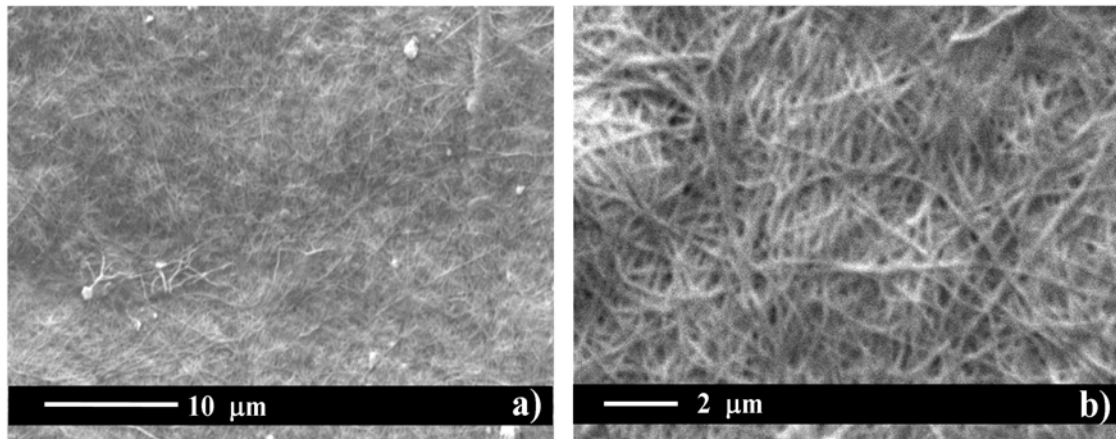


Figura 3.3 - Micrografias de MEV da superfície da membrana de celulose produzida por *G. hansenii*. (a) 4000× e (b) 8000×.

A Figura 3.4 apresenta as micrografias ópticas (a e b) e imagens de MEV (c e d) de membranas CBP secas, com diferentes diâmetros de poros. Os poros foram produzidos com formato circular, com diâmetro médio de 300 µm, distribuídos na superfície da membrana, como pode ser observado na Figura 3.4 (a). As bordas dos poros são uniformes e não apresentam falhas (Figura 3.4 (b)). As membranas com poros grandes (>200 µm) são indicadas para o tratamento preventivo e cicatrização de feridas, em especial aqueles em que a exudação e a oxigenação são necessárias (Siqueira, 2003). A Figura 3.4 (c) mostra a membrana de CB que foi sintetizada utilizando um suporte com pinos com 60 µm de diâmetro. Um poro de forma circular com aproximadamente 60 µm de diâmetro é mostrado na Figura 3.4 (c). As dobras que aparecem são resultantes da preparação da amostra para a análise de MEV. Os detalhes das bordas do poro, como podem ser observados na Figura 3.4 (d) são similares aos dos poros grandes. Os poros não apresentam falhas que possam provocar trincas ao longo da superfície, e conseqüentemente, rasgarem a membrana.

Os poros com diâmetros menores que 100 µm são apropriados para evitar a contractura da lesão devido à migração retardada dos fibroblastos em função do

arcabouço poroso. As membranas com poros entre 10 e 100 μm são materiais interessantes para aplicações médicas por possibilitarem a migração seletiva de células através dos poros (filtro celular).

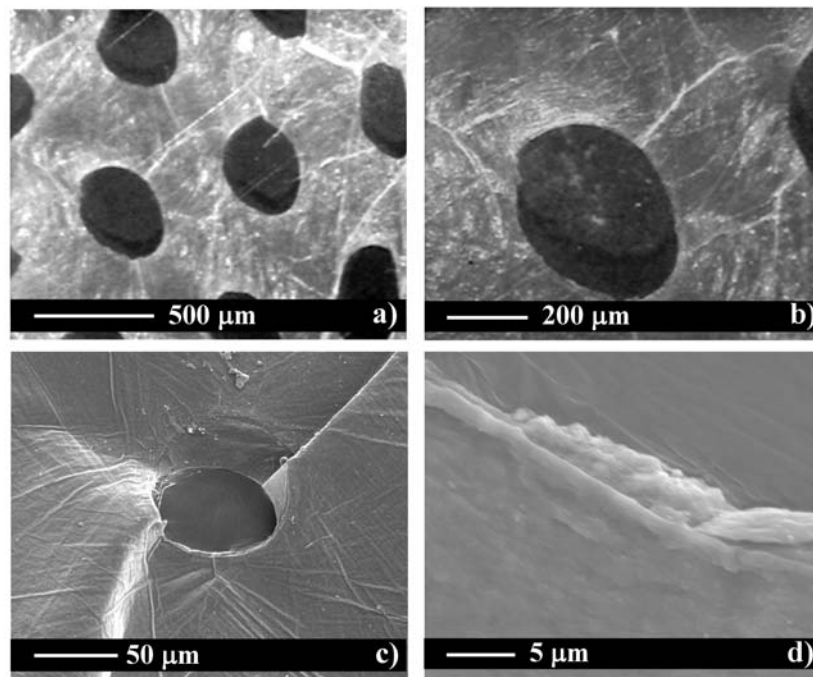


Figura 3.4 - Micrografias ópticas (a,b) e MEV (c,d) das membranas de CBP. As Figuras b e d são imagens amplificadas das mesmas amostras das Figuras a e c, respectivamente.

3.3.3 Avaliação da cristalinidade das membranas

Os difratogramas de raios X das membranas de CB e CBP são mostrados na Figura 3.5. Os três principais picos apresentados no espectro são atribuídos aos planos de reflexões $(1\bar{1}0)$, (110) e (200) característicos de celulose tipo I (Tokoh *et al.*, 1998). Apesar de apresentar uma pequena diferença nas intensidades dos picos entre as membranas CB (Figura 3.5a) e CBP (Figura 3.5b), nenhum deslocamento de pico pode ser observado entre os dois espectros, indicando, portanto, que não ocorreu alteração na cristalinidade da membrana em função da introdução da

matriz para modelar os poros. O grau estimado de cristalinidade da membrana de CB foi de 56,5% e da membrana de CBP foi de 51,5%.

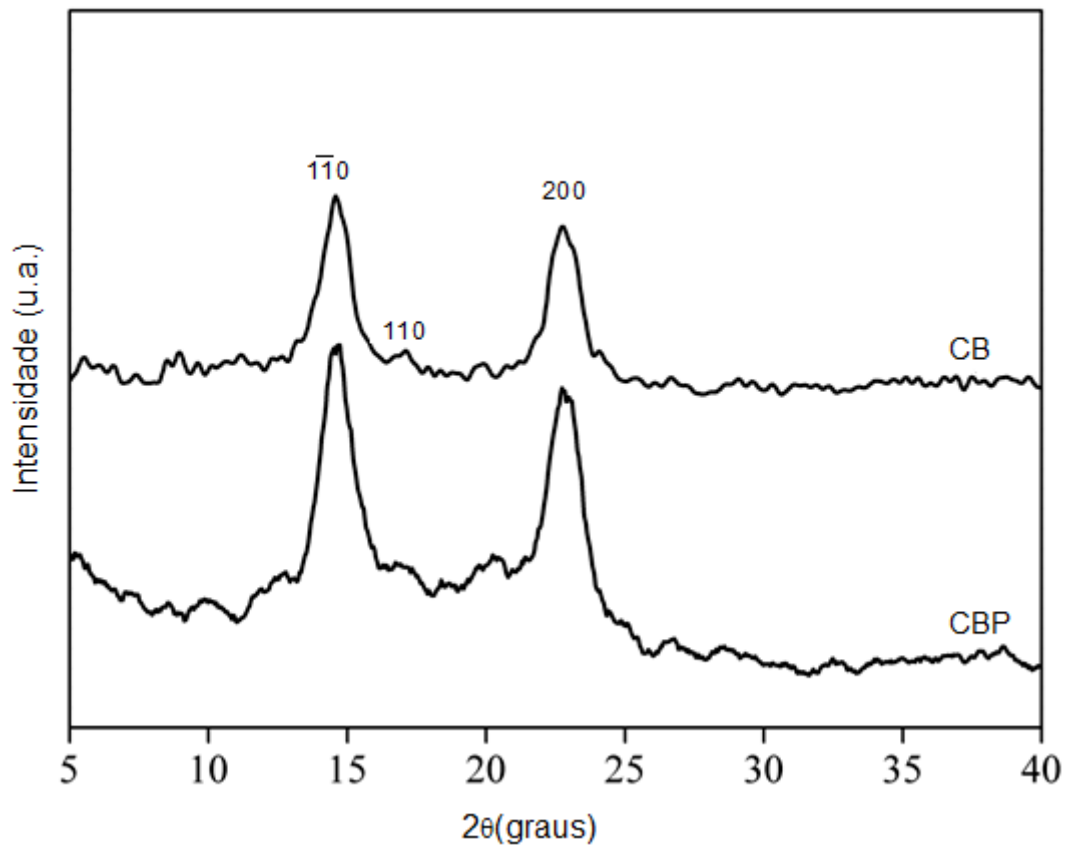


Figura 3.5 – Resultados da difração de raios X das membranas de CB e de CBP. Os picos apresentados são característicos de celulose tipo I. (a) CB e (b) CBP.

3.3.4 *Análise tensão-deformação da membrana porosa*

A Figura 3.6 mostra as curvas de tensão-deformação das membranas CB e CBP obtidas do ensaio de tração. Ambas as membranas apresentaram resistência à tração relativamente baixa. A ruptura ocorreu sob uma tensão de 1,7% para a membrana porosa CBP e 3,4% para a membrana CB. As tensões de ruptura (i.e., tensões máximas) da CB e CBP foram 32 MPa e 28 MPa, respectivamente. Na literatura é citado que a tensão de ruptura das membranas de CB não tratadas com

NaOH é mais elevada, em torno de 65 MPa (George *et al.*, 2005b). Os valores de tensão mais baixos das membranas tratadas com NaOH podem ser atribuídos ao inchamento das fibras. Devido a esse inchamento, a disposição das fibras pode ser alterada e isso pode contribuir para a redução da força mecânica (Mantanis *et al.*, 1995). Embora a membrana CBP seja um material poroso apresentou força mecânica similar à membrana CB não porosa.

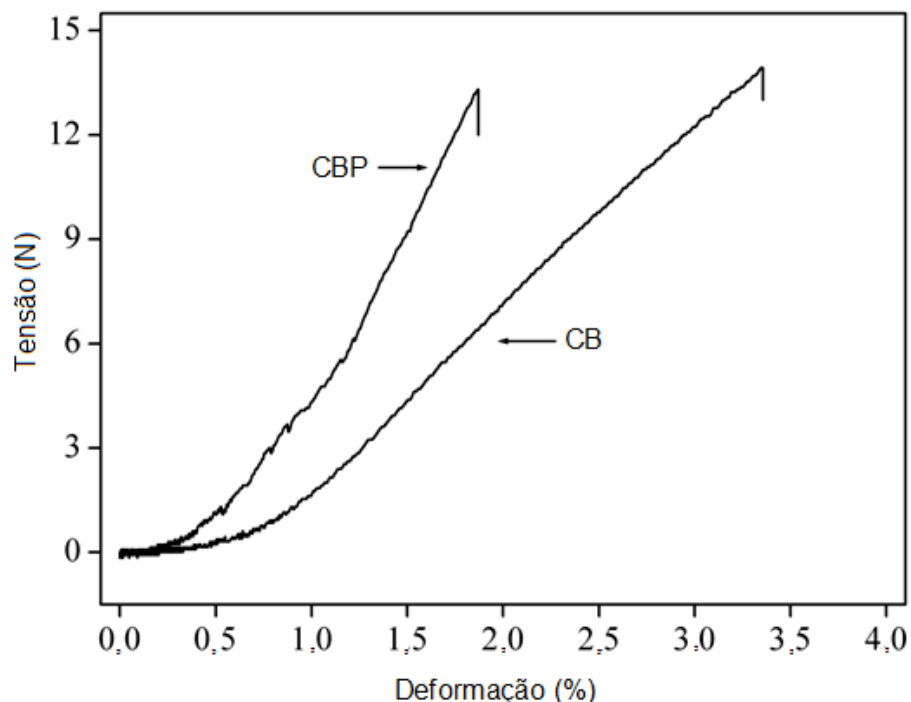


Figura 3.6 – Curvas de tensão-deformação das membranas CB e CBP obtidas do ensaio de tração.

A Tabela 3.1 mostra as propriedades das membranas CB e de CBP determinadas neste trabalho comparando com dados citados na literatura. As propriedades físico-químicas da membrana porosa não foram afetadas significativamente pela presença dos poros.

Tabela 3.1 – Propriedades da celulose bacteriana

Propriedade	CB (outros trabalhos)	Referências	Neste trabalho	
			CB	CBP
Ensaio de tração	10 - 70 MPa	(Gomez-Carracedo <i>et al.</i> , 2004; George <i>et al.</i> , 2005b)	32±5 MPa	28±5 MPa
<i>Td</i>	> 300°C	(George <i>et al.</i> , 2005a)	–	341°C
Cristalinidade	40 - 70%	(Tokoh <i>et al.</i> , 1998; Watanabe <i>et al.</i> , 1998)	56±5%	51±5%

Td = temperatura de degradação.

3.4 Conclusões

As membranas de nanofibras de CB com tamanho e forma dos poros controlados foram produzidas de acordo com o cultivo adequado da bactéria *G. hansenii*. O molde utilizado para formar os poros não interferiu na síntese da membrana, atuando como uma superfície bioinerte, permitindo que as bactérias sintetizassem as fibras de celulose em torno dos mesmos. O método permitiu a produção de membranas porosas, com poros de formato arredondado, distribuídos uniformemente na membrana e com diâmetro variando de 60 a 300 µm. As propriedades físico-químicas das membranas de CB não foram significativamente afetadas pela formação dos poros. As membranas porosas secas não apresentaram falhas nas bordas dos poros. As membranas produzidas possuem macro e microestrutura apropriada para serem utilizadas em aplicações de regeneração de pele e de tecido cartilaginoso, devido à sua rede de nanofibras que podem promover o crescimento das células, melhorarem a oxigenação do tecido e atrasar a migração dos fibroblastos, evitando dessa forma a contração da lesão e o retardo do processo de cicatrização, permitindo assim a recuperação adequada da lesão.

Capítulo 4

**Corpos Tridimensionais de Hidrogel de
Celulose Bacteriana**

Resumo

Corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-3D) foram produzidos utilizando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* em culturas sob condições agitadas e meio de cultivo apropriados. Estas estruturas gelatinosas diferem das membranas de celulose bacteriana (CB), pois se apresentam como corpos macroscópicos com geometria esferóide, elipsóide ou ovóide, compostos por uma massa gelatinosa envolvida por uma densa membrana, de espessura que varia entre 0,2 a 2 mm. A avaliação da microestrutura de HCB-3D liofilizada revelou que seu interior é constituído por uma matriz celular de forma hexagonal, formando de uma rede de nanofibras de celulose entrelaçadas. A membrana que recobre esta estrutura é formada por uma rede de nanofibras de celulose mais densa. Estes corpos podem ser utilizados em diversas aplicações na engenharia de tecidos bem como para a regeneração de tecidos e para o desenvolvimento de produtos médicos.

4.1 Introdução

Tradicionalmente a CB é produzida em culturas estáticas utilizando bactérias do gênero *Gluconoacetobacter*, que produz uma membrana de celulose na superfície do meio de cultivo. O processo de produção é muito simples, de baixo custo e extensivamente utilizado (Masaoka *et al.*, 1993; Jonas e Farah, 1998).

Estudo sobre produção de CB em condições de culturas agitadas, em agitador orbital, tem mostrado que essa forma de cultivo produz corpos milimétricos, entre 10 μm e 10 mm de diâmetro, com diferentes formatos: esféricos, estrelados e filamentosos (Schramm e Hestrin, 1954a; Czaja *et al.*, 2004).

A instabilidade de linhagens bacterianas para produzir celulose em sistemas de cultura agitada tem sido um grande problema enfrentado por diversos pesquisadores.

Bactérias produtoras de celulose, quando transferidas para culturas agitadas, espontaneamente se transformam em linhagens não produtoras de celulose, implicando no aumento da densidade celular, porém com baixo rendimento de celulose (Czaja *et al.*, 2004). Tem sido observado que a adição de etanol ao meio de cultivo evita essas instabilidades e, além disso, estimula a biossíntese, proporcionando melhor rendimento em sistemas agitados (Son *et al.*, 2001; Heo e Son, 2002).

O manitol, um poliálcool, tem sido utilizado como fonte de carbono para a produção de celulose por bactérias *Gluconacetobacter*, proporcionando melhor rendimento do que a glicose. Estudo realizado com *A. xylinum* KU-1, cultivada sob condições estáticas, demonstrou que ela produz três vezes mais celulose quando a fonte de carbono é manitol comparando-se com a fonte de carbono glicose (Oikawa *et al.*, 1995). Estudos com a bactéria *G. hansenii*, linhagem ATCC 10821, cultivada sob condições estáticas, também confirmaram que esta produz mais celulose quando a fonte de carbono é manitol (Hutchens *et al.*, 2007).

Neste estudo foi investigada a formação de corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-3D) sob condições agitadas utilizando manitol como fonte de carbono. As características estruturais e físicas de HCB-3D foram determinadas e comparadas com membranas de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-M).

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 *Produção de corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-3D) e de membranas de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-M)*

O microrganismo utilizado, a preparação do inóculo, o método de esterilização do meio de cultivo e o tratamento de purificação do hidrogel produzido seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.

4.2.1.1 *Meio e condições de cultivo*

Os experimentos foram realizados sob condições de culturas estáticas ou agitados. Em ambos os casos eles foram desenvolvidos em frascos Erlenmeyer com as seguintes proporções utilizadas: volume de frasco/volume de meio de cultivo = 5:1, como, por exemplo: em frascos Erlenmeyer de 250 ml o volume do meio de cultivo foi de 50 ml. A composição do meio de cultivo utilizada foi: manitol ($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), extrato de levedura ($5,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) e bactopectona ($3,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Ao meio de cultivo esterilizado e resfriado foram adicionados 5% (v/v) do inóculo preparado previamente.

Os experimentos sob condições estáticas foram mantidos em temperatura ambiente, e os experimentos sob condições agitadas foram mantidos em agitador orbital a 2,5 Hz, 30°C. Decorridos 14 dias, a massa gelatinosa produzidas em ambos os ensaios foi coletada e submetida ao tratamento de purificação.

4.2.2 *Dinâmica da produção dos corpos HCB-3D*

Para determinar a dinâmica de produção dos corpos HCB-3D sob condições agitadas, a bactéria *G. hansenii* foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 100 ml

contendo 13 ml de meio de cultivo que foi preparado conforme já descrito no item 4.2.1.

Diariamente foram retirados três frascos que foram centrifugados a 83 Hz por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido ao tratamento de purificação para eliminar as células e contaminantes do meio de cultivo. Após o tratamento de purificação os três frascos foram novamente centrifugados a 83 Hz por 20 minutos para eliminar a solução de purificação, e foram lavados três vezes com água destilada seguido de centrifugação a cada lavagem. A celulose produzida foi pesada para determinar-se a massa hidratada, e em seguida, seca em estufa a 50°C até massa constante para determinação da massa seca.

4.2.3 *Influência da agitação na produção dos corpos HCB-3D*

Para determinar a influência da agitação na formação das estruturas 3D foram realizados ensaios variando-se a velocidade de agitação e o volume do meio de cultivo. As velocidades de agitação foram 0,83 Hz, 1,66 Hz, 2,50 Hz e 3,33 Hz, e os volumes de meio de cultivo foram 10, 20, 30, 40, 50 e 60 ml. A bactéria *G. hansenii* foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 100 ml contendo meio de cultivo que foi preparado conforme já descrito no item 4.2.1.

Os experimentos foram mantidos em agitador orbital, a 30°C, durante sete dias. Após este período, a massa gelatinosa foi coletada e submetida ao tratamento de purificação, seguido do processo de lavagem até neutralização. Na seqüência, as amostras foram medidas, pesadas, fotografadas e submetidas à secagem em estufa a 50°C até massa constante para determinação da massa seca. Amostras do meio de cultivo foram congeladas para a determinação do manitol residual.

4.2.3.1 *Determinação da concentração de manitol em amostras do cultivo*

Para a determinação da concentração de manitol em amostras do meio de cultivo foi utilizado o método descrito por Sanchez (1998). O método baseia-se na reação de oxidação do manitol com periodato de sódio, liberando formaldeído. O formaldeído, na presença de acetato de amônio, reage com acetilacetona, o que resulta numa solução de cor amarela, e que tem absorvância máxima em 412 nm (Sanchez, 1998).

Amostras de 0,1 ml do meio de cultivo contendo manitol (ou de uma solução de manitol (25 g·l⁻¹) para a confecção da curva padrão) foram colocadas em um tubo com rosca onde foram acrescentados 0,5 ml de uma solução tampão formato (0,5 M e pH 3) e 0,3 ml de uma solução de periodato de sódio (5 mM). Os tubos foram então deixados por 15 s em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 0,3 ml de uma solução contendo acetilacetona (0,1 M), acetato de sódio (2 M) e tiosulfato de sódio (0,02 M). Os tubos foram fechados, agitados e colocados em banho-maria por 2 min. Após este período os tubos foram resfriados em um banho com água, e foram realizadas as leituras de absorvância em espectrofotômetro (Spectrum SP-1105, Shanghai Spectrum Instruments Co., Ltd - Shanghai, China) em comprimento de onda igual a 412 nm.

4.2.3.2 *Liofilização dos corpos HCB-3D*

Os hidrogéis HCB-3D previamente congelados foram desidratados através do processo de liofilização (Liofilizador LH Terroni Equipamentos Científicos Ltda) sob vácuo, com a oscilação de temperatura entre -10°C e -25°C. Após secagem, as amostras foram devidamente embaladas e conservadas em congelador.

4.2.4 Caracterização dos corpos HCB-3D e de membranas HCB-M

A microestrutura e a microarquitetura dos corpos HCB-3D foram caracterizadas por MEV, conforme descrito no item 3.2. A cristalinidade foi analisada por difratometria de raios X, também descrito no item 3.2.

4.2.4.1 Microporosidade

A microporosidade das membranas foi estimada através de análise de imagem, utilizando o software *Image Tool for Windows* versão 3.0. A microporosidade é atribuída aos poros (espaços vazios) entre as fibras, que possuem diâmetros equivalentes entre 50 e 700 nm.

4.2.4.2 Resistência à tração

O ensaio de resistência à tração das estruturas HCB-3D foi realizado em temperatura ambiente, utilizando a máquina Emic DL2000, São José dos Pinhais, PR, célula Trd 21, extensômetro Trd 15, programa de computador TESC versão 3.01, e um conjunto de três amostras de corpo de prova com dimensões de 65 × 1,25 mm. A velocidade do ensaio foi mantida em 1 mm·min⁻¹ durante todo o ensaio. A curva tensão-deformação foi construída utilizando-se o software Origin®, versão 7.0.

4.2.4.3 Conteúdo de água nos hidrogéis

O conteúdo de água dos corpos tridimensionais HCB-3D e das membranas HCB-M foi medida da seguinte maneira: 1) remoção do excesso de água da superfície e determinação da massa do hidrogel ($m_{hidrogel}$); 2) secagem do

hidrogel em estufa a 50°C até massa constante para a determinação da massa seca (m_{seca}).

O conteúdo de água no hidrogel ($conteúdo_{água}$) foi calculado de acordo com a Equação (4.1).

$$conteúdo_{água} = (m_{hidrogel} - m_{seca}) / m_{hidrogel} \quad (4.1)$$

4.2.4.4 Reidratação de CB corpos tridimensionais e CB membranas

A reidratação de amostras dos corpos tridimensionais HCB-3D e das membranas HCB-M foi realizada da seguinte maneira: 1) determinação da massa seca (m_{seca}) das amostras secas em estufa à 50°C, até massa constante; 2) reidratação das amostras através da imersão em 30 ml de água destilada, mantidas em agitador orbital (2,5 Hz), a 30°C; 3) determinação da massa das amostras reidratadas após 2, 24, 48, 72 e 96 horas ($m_{reidratada}$).

A capacidade de reabsorção de água ($cap_{absorção}$) foi calculada de acordo com a Equação (4.2). O percentual de ganho de massa das amostras foi expresso em função do tempo.

$$cap_{absorção} = (m_{reidratada} - m_{seca}) / m_{reidratada} \quad (4.2)$$

4.3 Resultados e discussão

Como já descrito, a tendência de linhagens de *G. hansenii* produtoras de celulose em se transformar em não produtoras de celulose tem sido a grande dificuldade de culturas em sistemas agitados. Uma das possíveis causas dessa instabilidade tem sido atribuída a elementos de transposição, que possuem a capacidade de se inserirem em diferentes regiões do genoma, inativando genes essenciais à biossíntese da celulose (Coucheron, 1991). Várias alternativas têm sido experimentadas para a seleção de linhagens estáveis, envolvendo métodos de

transferência seriais em culturas estáticas e agitadas. Tem sido observado ainda, que o tipo de fonte de carbono e a adição ou não de etanol ao meio de cultivo influenciam na ocorrência dessas instabilidades (Krystynowicz *et al.*, 2002). Estudos prévios demonstraram que a adição de etanol ao meio de cultivo tanto favorece a produção de celulose, como também a perda da capacidade de bactérias produtoras de celulose em bactérias não produtoras (Son *et al.*, 2001; Heo e Son, 2002; Kornmann *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2005).

O poliálcool manitol pode ser utilizado para a produção de celulose por *G. hansenii* e produzir os efeitos positivos da adição de etanol ao meio de cultivo. Um estudo realizado com a bactéria *A. xylinum* KU-1 demonstrou que quando essa bactéria é cultivada sob condições estáticas usando manitol produz três vezes mais celulose do que usando glicose como fonte de carbono (Oikawa *et al.*, 1995). Hutchens e colaboradores (2007) estudaram diversas fontes de carbono, sob condições estáticas, para o cultivo da bactéria *G. hansenii*, linhagem ATCC 10821, visando a produção de celulose. Esses estudos demonstraram que o manitol foi favorável para produção de celulose (Hutchens *et al.*, 2007).

A utilização de manitol por linhagens *Gluconacetobacter* para a produção de celulose sob condições agitadas não tem sido explorada. Até onde nos é conhecido, estudos de produção de CB, em condições de cultivo agitado e utilizando manitol como fontes de carbono não foram reportadas na literatura.

4.3.1 Metabolismo do manitol por *G. hansenii*

A capacidade de *G. hansenii* utilizar o manitol como fonte de carbono para a produção de celulose é mostrada na Figura 4.1, que apresenta a via do metabolismo do manitol, deduzida a partir de dados da literatura e do banco de dados de vias metabólicas do KEGG, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Ross *et al.*, 1991; Oikawa *et al.*, 1995; Dewulf *et al.*, 1996; Kanehisa e Goto, 2000).

O manitol pode ser utilizado por microrganismos como fonte de carbono para o seu desenvolvimento e para a biossíntese de metabólitos secundários. O metabolismo do manitol por esses microrganismos envolve a ação de quatro enzimas: a glicose permease (EC 2.7.1.69), responsável pela fosforilação do manitol; o manitol-1-fosfato pode ser diretamente convertido a frutose-6-fosfato pela ação da enzima manitol-1-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.17) ou convertido novamente a manitol pela enzima manitol-1-fosfatase (EC 3.1.3.22) para, então, a enzima manitol desidrogenase (EC 1.1.2.22) converter o manitol em frutose; a enzima hexoquinase (EC 2.7.1.1) catalisa a reação da frutose à frutose-6-fosfato (Kanehisa e Goto, 2000).

A hexose-fosfato sintetizada a partir de manitol pode ser utilizada na rota Entner-Doudoroff para a produção de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato e, conseqüentemente, acetil-CoA, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e biomassa; ou, numa outra via, a glicose-6-fosfato (G6P) pode ser convertida à glicose-1-fosfato (G1P) pela ação da enzima fosfoglicomutase (EC 5.4.2.2), seguida por reação de isomerização catalisada pela enzima UDP-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9), onde a G1P é convertida em UDP-glicose, utilizando uma molécula de uridina trifosfato (UTP) e liberando uma molécula de pirofosfato (PPi). A molécula UDP-glicose é a precursora da biossíntese da celulose. A polimerização de glicose em cadeias $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana é realizada pela enzima celulose sintase (EC 2.4.1.12) (Ross *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1996), com o auxílio do complexo enzimático codificado pelo operon *bcs*.

Neste estudo foi demonstrada experimentalmente a produção de celulose por *G. hansenii* a partir de manitol como fonte de carbono sob condições agitadas.

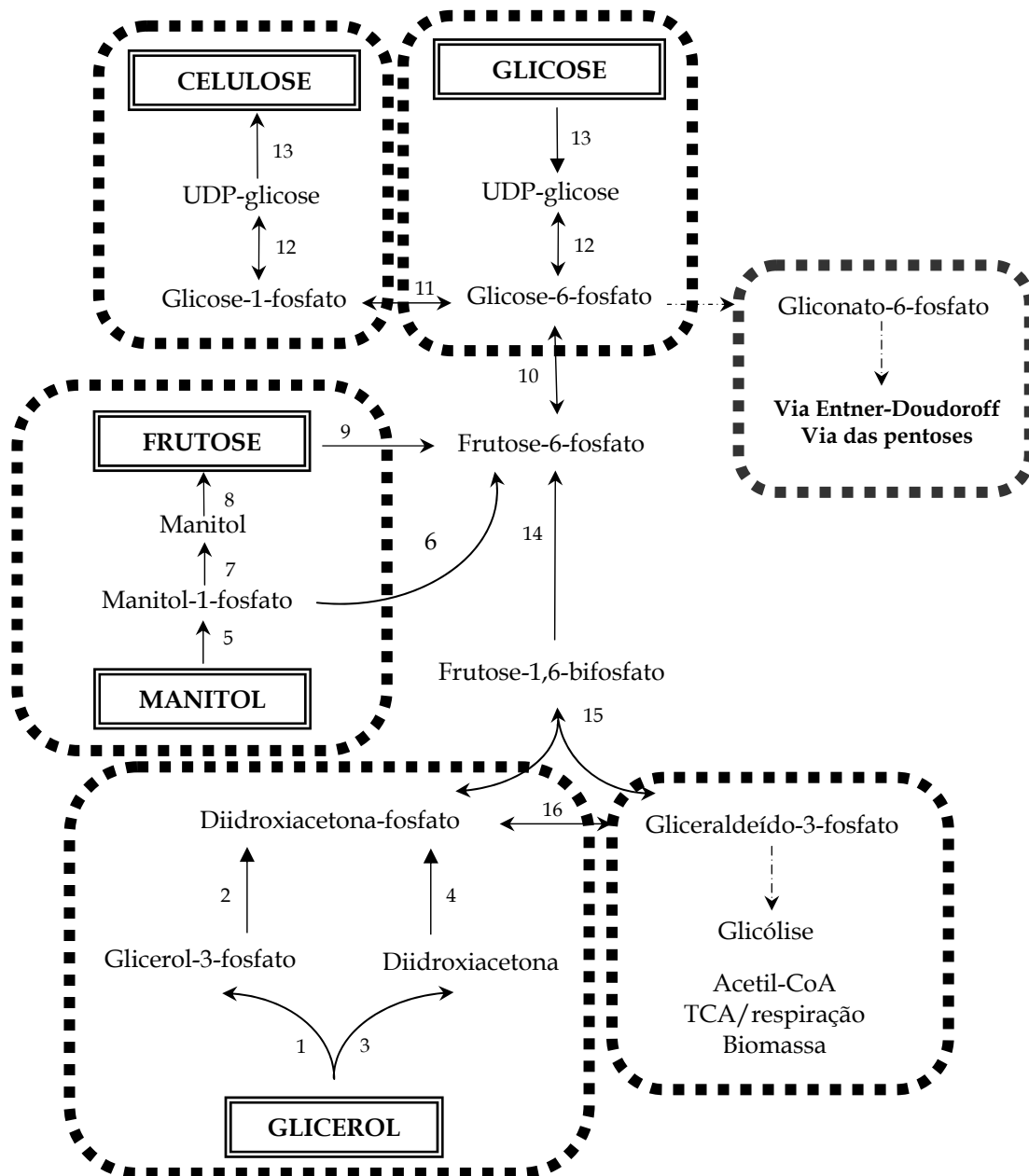


Figura 4.1 - Proposta para o metabolismo do manitol por *G. hansenii*, demonstrando a via bioquímica de produção de celulose, deduzida a partir de dados da literatura e do banco de dados do KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Ross *et al.*, 1991; Oikawa *et al.*, 1995; Dewulf *et al.*, 1996; Kanehisa e Goto, 2000). Enzimas: (1) glicerol quinase (EC 2.7.1.30); (2) glicerol-3-fosfato-desidrogenase (EC 1.1.99.5); (3) glicerol oxidase (EC 1.1.3.21); (4) diidroxiaçetona quinase (EC 2.7.1.29); (5) glicose permease (EC 2.7.1.69); (6) manitol-1-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.17); (7) manitol-1-fosfatase (EC 3.1.3.22); (8) manitol desidrogenase (EC 1.1.2.2); (9) hexoquinase (EC 2.7.1.1); (10) glicose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9); (11) fosfoglicomutase (EC 5.4.2.2); (12) UDP- glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9); (13) celulose sintase (EC 2.4.1.12); (14) frutose-1,6-bifosfatase (EC 3.1.3.11); (15) frutose bifosfatase aldose (EC 4.1.2.13); (16) triose fosfato isomerase (EC 5.3.1.1).

4.3.2 Produção de membranas HCB-M

O cultivo de *G. hansenii* sob condições estáticas utilizando manitol como fonte de carbono produziu uma película na superfície ar-líquido do meio de cultivo que foi coletada após 14 dias de cultivo (Figura 4.2). A película purificada é constituída de uma membrana de pura celulose. No estado hidratado a membrana de celulose é um hidrogel altamente resistente, homogêneo e translúcido. A sua massa no estado hidratado é constituída de aproximadamente 99% de água. Quando seca a sua espessura é cerca de 100 μm .



Figura 4.2 – Membrana de hidrogel de CB produzida por *G. hansenii* em condições estáticas.

4.3.3 Produção de corpos HCB-3D

A morfologia macroscópica da CB depende das condições de cultivo (Hestrin e Schramm, 1954; Watanabe *et al.*, 1998; Czaja *et al.*, 2004). A CB sintetizada por *G. hansenii* em condições estáticas produz uma membrana gelatinosa na superfície do meio de cultivo, conforme mostrado na Figura 4.2. Entretanto, em condições de cultivo agitado tem sido relatado que linhagens de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* produzem partículas celulósicas de várias formas (esférica, elipsóide, estrelada e fibrosa) e com dimensões que variam de 10 μm a 10 mm (Hestrin e Schramm, 1954; Czaja *et al.*, 2004).

Neste estudo, a CB sintetizada por *G. hansenii* em agitador orbital, utilizando manitol como fonte de carbono, resultou em corpos tridimensionais macroscópicos de CB (HCB-3D), de formatos variados, conforme pode ser observado na Figura 4.3. Estes corpos HCB-3D foram produzidos em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultivo. As amostras retiradas do meio de cultivo sem qualquer tratamento de purificação são mostradas na Figura 4.3(a), enquanto a Figura 4.3(b) mostra as estruturas após tratamento de purificação.

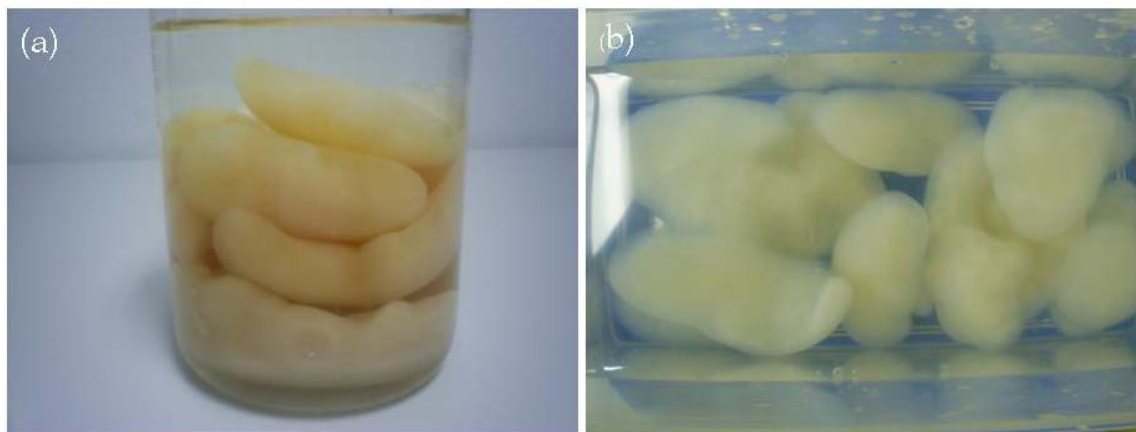


Figura 4.3 - Hidrogel de HCB-3D de formato variado, produzido por *G. hansenii* em agitador orbital. (a) Estruturas HCB-3D gelatinosas retiradas do meio de cultivo sem qualquer tratamento de purificação; (b) estruturas HCB-3D gelatinosas após tratamento de purificação.

É importante observar que as dimensões dessas estruturas são dependentes do volume do meio de cultivo e do diâmetro do frasco Erlenmeyer utilizado no cultivo. As culturas que foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 1000 ml contendo 150 ml de meio de cultivo produziram corpos tridimensionais gelatinosos com massa média de aproximadamente 100 g, como a que está sendo mostrada na Figura 4.4. A estrutura 3D da Figura 4.4 possui um formato elipsóide, lembrando um “cocoon” (casulo), com as seguintes dimensões no estado hidrogel: eixo maior = 130 mm; eixo menor = 60 mm, altura = 25 mm e quando seca em estufa a 50°C apresenta as seguintes dimensões: eixo maior = 120 mm;

eixo menor = 55 mm, altura = 0,2 mm. Na Figura 4.4a é mostrada a vista lateral da estrutura 3D e na Figura 4.4b é mostrada a vista frontal.

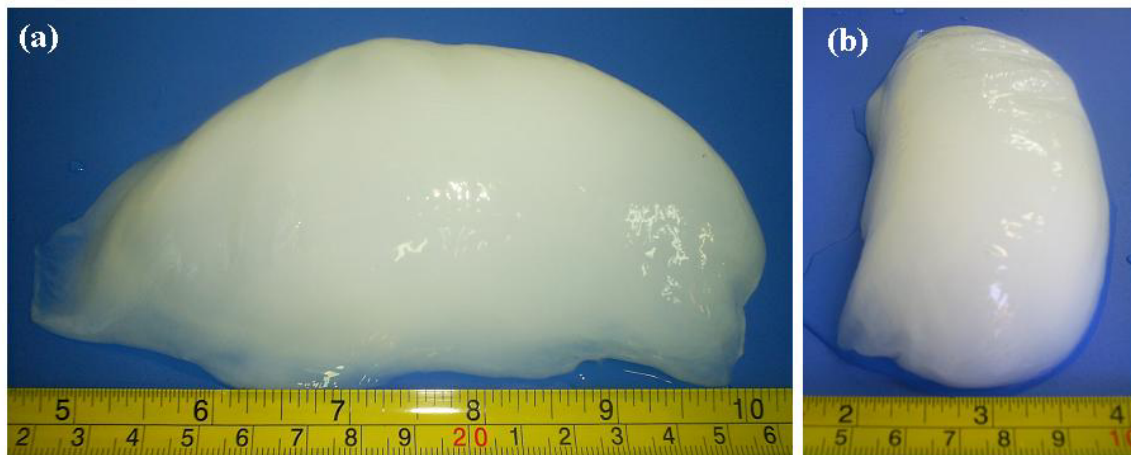


Figura 4.4 - Hidrogel HCB-3D produzido por *G. hansenii* em agitador orbital, (a) vista lateral e (b) vista frontal. Dimensões do elipsóide achatado: eixo maior = 13 cm; eixo menor = 5 cm, altura = 2,5 cm.

Na Figura 4.5 pode-se observar que esse corpo gelatinoso, quando seccionado, possui uma membrana revestindo-o e internamente forma-se um material gelatinoso constituído pelos filamentos de hidrogel celulósico.

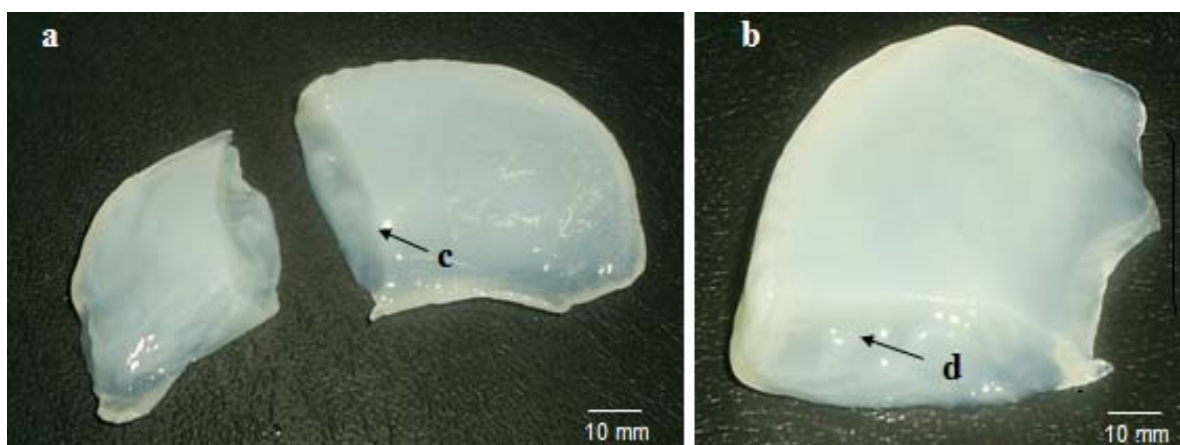


Figura 4.5 - Estrutura hidrogel de HCB-3D seccionada. (a) Vista lateral de HCB-3D seccionada e (b) vista frontal. Em (c), a membrana densa que reveste a estrutura de HCB-3D, e em (d) a massa gelatinosa que preenche o interior da estrutura.

4.3.4 Evolução temporal da formação dos corpos HCB-3D

A evolução temporal da formação de estruturas HCB-3D gelatinosas é mostrada na seqüência de fotos da Figura 4.6. Na Figura 4.6 (a) é mostrado o cultivo de *G. hansenii* em condição agitada após o primeiro dia, utilizando manitol como fonte de carbono. Observou-se a ocorrência de grânulos dispersos no meio de cultivo. No segundo dia de cultivo, Figura 4.6 (b), observou-se um considerável aumento na quantidade de grânulos. Estes grânulos possuíam uma estrutura filamentosa em formatos estrelados. Nos dias subseqüentes observou-se que estas estruturas aumentaram de tamanho e se agregaram umas às outras. Na Figura 4.6 (c), correspondente ao quinto dia de cultivo, pode ser observado que todas as pequenas estruturas estavam agregadas em uma única estrutura 3D, na forma de um esferóide ou de um elipsóide, em geral achatado. Estas estruturas 3D foram aumentando o seu tamanho nos dias de cultivo subseqüentes, como pode ser observado nas Figura 4.6 (d) - (f).

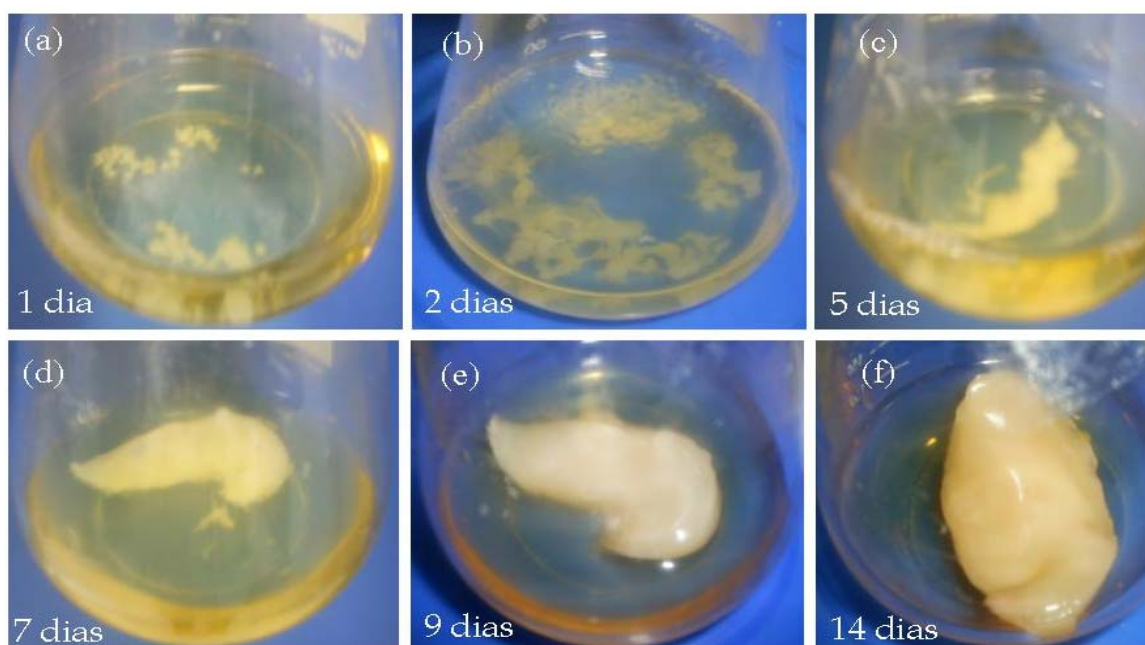


Figura 4.6 - Evolução da formação de estruturas HCB-3D produzidas por *G. hansenii* em agitador orbital.

4.3.5 Dinâmica de produção dos corpos HCB-3D

A maioria das pesquisas realizadas para a produção de celulose com linhagens *Glucoacetobacter* são feitas sob condições de cultura estática. Quando elas são realizadas em condições de cultura agitada, tem sido reportado baixo rendimento em celulose devido à instabilidade das bactérias em manter-se bactérias não produtoras de celulose (Kouda *et al.*, 1997; Tsuchida e Yoshinaga, 1997; Hwang *et al.*, 1999). Este fato não foi observado com a linhagem bacteriana utilizada em nosso estudo. Raramente foi observado a não produção de celulose nas condições de cultivo utilizadas. A Figura 4.7 mostra a dinâmica de produção dos corpos tridimensionais HCB-3D.

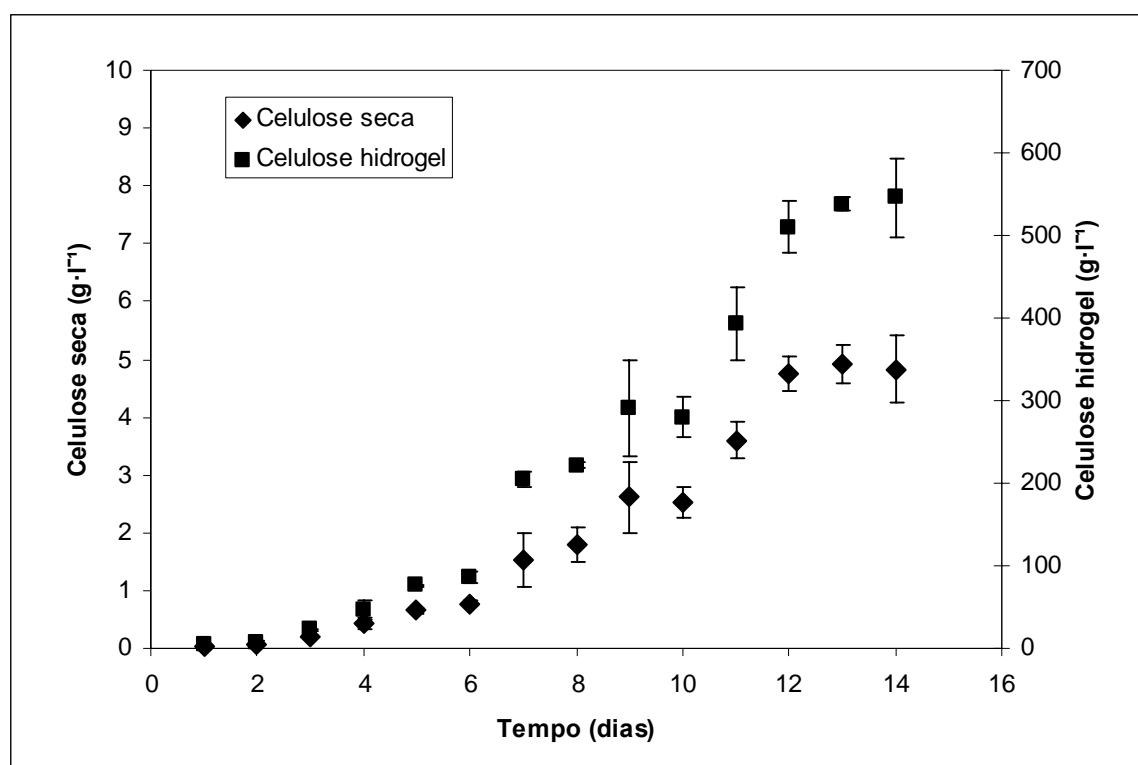


Figura 4.7 - Dinâmica da produção dos corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana, em 13 ml de meio de cultivo.

O principal aumento da massa de celulose ocorreu entre o sexto e o décimo segundo dia de cultivo. A partir do décimo terceiro dia ocorreu ligeiro aumento na

massa do hidrogel, porém não foi registrado aumento na produção de celulose. Este aumento de massa do hidrogel está relacionado com o aumento do conteúdo de água. No décimo quarto dia de cultivo todo o líquido do meio de cultivo havia sido absorvido pela estrutura hidrogel. A quantidade máxima de celulose seca produzida foi de $4,93 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ no décimo terceiro dia de cultivo.

A Tabela 4.1 apresenta os dados medidos durante o ensaio para verificar a dinâmica da produção de celulose por *G. hansenii* em agitador orbital, utilizando manitol como fonte de carbono.

Tabela 4.1 - Quantidade de hidrogel de celulose, celulose seca e o conteúdo de água no hidrogel produzido por *G. hansenii* durante 14 dias em agitador orbital, 2,5 Hz, em 13 ml de meio de cultivo. Ensaio realizado em triplicata.

Tempo de cultivo (dias)	Massa de celulose hidrogel ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Massa de celulose seca ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	Conteúdo de água (%)
1	$4,23 \pm 0,99$	$0,04 \pm 0,01$	99,03
2	$7,36 \pm 0,91$	$0,07 \pm 0,01$	99,06
3	$22,14 \pm 1,15$	$0,20 \pm 0,09$	99,09
4	$47,34 \pm 10,39$	$0,42 \pm 0,07$	99,12
5	$75,95 \pm 0,61$	$0,65 \pm 0,05$	99,15
6	$85,77 \pm 6,58$	$0,78 \pm 0,05$	99,09
7	$204,76 \pm 9,63$	$1,54 \pm 0,46$	99,25
8	$221,73 \pm 3,59$	$1,80 \pm 0,30$	99,19
9	$290,80 \pm 57,29$	$2,62 \pm 0,61$	99,10
10	$280,12 \pm 24,81$	$2,53 \pm 0,26$	99,10
11	$393,58 \pm 44,57$	$3,59 \pm 0,31$	99,09
12	$510,30 \pm 30,80$	$4,75 \pm 0,29$	99,07
13	$537,64 \pm 8,03$	$4,93 \pm 0,34$	99,08
14	$545,46 \pm 48,61$	$4,83 \pm 0,57$	99,11

4.3.6 Influência da agitação na formação dos corpos HCB-3D

Estudos realizados por Borzani e Desouza (1995) verificaram que em culturas estáticas o aumento da espessura da membrana acontece devido à formação de novas camadas de celulose na interface membrana/ar. Isto ocorre pela necessidade do suprimento de oxigênio, uma vez que as bactérias são estritamente aeróbicas. Eles verificaram também que os nutrientes do meio de cultivo se difundem através da membrana. Em culturas agitadas a síntese de celulose ocorre no meio de cultivo, e a produtividade depende da transferência de oxigênio (Kouda *et al.*, 1997).

Para verificar a influência da agitação e a proporção volume de frasco/volume de meio de cultivo na formação de corpos tridimensionais HCD-3D, tipo “cocoon”, foram realizados ensaios variando-se a velocidade de agitação e os volumes do meio de cultivo. As velocidades de agitação testadas foram 0,8 Hz, 1,6 Hz, 2,5 Hz e 3,3 Hz, e o volume de meio de cultivo foram 10, 20, 30, 40, 50 e 60 ml em frascos Erlenmeyer de 100 ml.

A Tabela 4.2 apresenta a produção de celulose e o consumo do manitol em função da velocidade de agitação e a Figura 4.8 mostra a morfologia macroscópica da massa celulósica obtida em função da velocidade de agitação e do volume do meio de cultivo. As características peculiares de cada ensaio são descritas a seguir.

A Figura 4.8a mostra que massa gelatinosa cobriu a superfície do meio de cultivo quando a velocidade de agitação utilizada foi 0,8 Hz e 60 ml de meio de cultivo. Os demais volumes de meio utilizados para essa velocidade de agitação também produziram massa gelatinosas similares. Nessa velocidade de agitação não ocorreu a formação de corpos tridimensionais HCB-3D tipo “cocoon”. A massa celulósica formada nessas condições de cultivo possui uma densa membrana cobrindo a superfície que fica em contato com o ar, similar a membrana que envolve as estruturas HCD-3D. Na Figura 4.8a(1) mostra a superfície em contato com o meio de cultivo e na Figura 4.8a(2) mostra a superfície em contato

com o ar. Observe que na superfície que ficou em contato com meio de cultivo não apresenta a membrana densa como a que se formou na superfície líquido-ar. Isso pode ser explicado pelo fato de que a maior quantidade de bactérias se encontra na superfície líquido-ar, uma vez que elas são estritamente aeróbicas. Dessa forma, maior quantidade de celulose está sendo produzida nesta camada. Com essa velocidade de agitação (0,8 Hz) também se verificou que o rendimento de celulose diminui com o aumento do volume do meio de cultivo. Quando o volume do meio de cultivo foi igual a 10 ml obteve-se um rendimento de $2,90 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, já quando se utilizou 60 ml o rendimento reduziu para $1,41 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (Tabela 4.2).

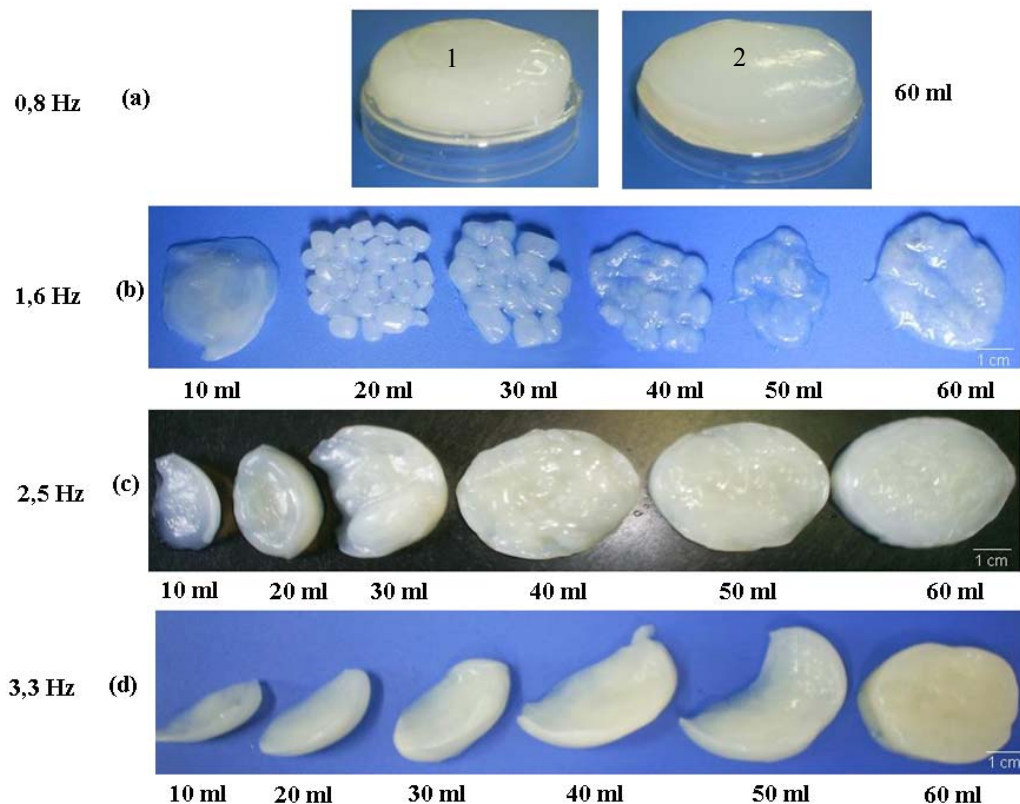


Figura 4.8 – Morfologia das estruturas macroscópicas HCB-3D produzidas em agitador orbital. a) Velocidade de rotação 0,8 Hz e volume de meio de cultivo 60 ml, (1) mostra a superfície em contato com meio de cultivo e em (2) a superfície em contato com o ar, (b) 1,6 Hz, (c) 2,5 Hz e (d) 3,3 Hz. Para todas as velocidades de agitação foram utilizados volumes de meio de cultivo de 10, 20, 30, 40, 50, 60 ml.

Tabela 4.2 – Produção de celulose e consumo do manitol em função da velocidade de agitação. Ensaios realizados em triplicata.

Ensaio	Veloc. de agitação (Hz)	Volume do meio cultivo (ml)	Massa do hidrogel (g)	Massa de celulose seca (g)	Conteúdo de água (%)	Conc. de celulose seca (g·l ⁻¹)	Consumo de manitol (%)
(a)	0,8	10	3,974 ± 0,117	0,029 ± 0,001	99,27	2,90	91,09
		20	7,782 ± 0,222	0,053 ± 0,001	99,31	2,67	89,14
		30	9,667 ± 0,222	0,069 ± 0,003	99,28	2,32	79,76
		40	9,158 ± 0,347	0,067 ± 0,003	99,27	1,67	64,99
		50	9,819 ± 0,283	0,075 ± 0,005	99,23	1,51	44,24
		60	13,513 ± 1,609	0,084 ± 0,006	99,38	1,41	24,35
(b)	1,6	10	1,492 ± 0,162	0,037 ± 0,002	97,49	3,74	71,60
		20	3,348 ± 0,560	0,070 ± 0,012	97,90	3,52	73,27
		30	5,362 ± 0,517	0,039 ± 0,005	99,27	1,31	76,37
		40	7,205 ± 0,891	0,038 ± 0,005	99,47	0,95	73,83
		50	10,105 ± 0,676	0,022 ± 0,006	99,78	0,44	54,06
		60	6,156 ± 0,589	0,023 ± 0,013	99,63	0,38	47,45
(c)	2,5	10	5,358 ± 0,025	0,047 ± 0,002	99,13	4,69	65,33
		20	11,914 ± 1,225	0,090 ± 0,003	99,24	4,51	67,99
		30	21,405 ± 0,691	0,207 ± 0,006	99,03	6,89	77,22
		40	26,993 ± 0,541	0,280 ± 0,014	98,96	7,00	75,58
		50	31,348 ± 0,986	0,306 ± 0,234	99,02	6,13	67,99
		60	32,640 ± 1,260	0,302 ± 0,013	99,07	5,04	57,69
(d)	3,3	10	5,349 ± 0,217	0,046 ± 0,003	99,13	4,65	77,12
		20	12,726 ± 0,605	0,089 ± 0,001	99,30	4,47	67,77
		30	18,073 ± 2,087	0,192 ± 0,010	98,94	6,41	72,03
		40	25,310 ± 1,861	0,242 ± 0,010	99,04	6,06	70,77
		50	29,521 ± 0,249	0,299 ± 0,002	98,99	5,98	74,00
		60	31,732 ± 0,430	0,309 ± 0,003	99,03	5,15	78,84

No ensaio a 1,6 Hz, Figura 4.8b, ocorreram algumas peculiaridades. Com o volume de 10 ml formou-se uma espécie de membrana um pouco distinta daquelas que se formaram sob velocidade de agitação de 0,8 Hz. Com os volumes de 20 e 30 ml formaram-se pequenas estruturas 3D tipo “cápsula”, de dimensões

médias de 8 mm de comprimento, 6 mm de largura e 4 mm de espessura. Para os volumes de 40 e 50 ml formaram-se algumas estruturas 3D tipo cápsula com fibras dispersas, e para o volume de 60 ml apenas duas estruturas tipo cápsula e muitas fibras dispersas. Com relação a quantidade de celulose produzida o ensaio com 1,6 Hz não foi favorável. Isso pode ser observado nas Figura 4.9 e Figura 4.10.

O ensaio que utilizou a velocidade de agitação igual 2,5 Hz mostrou-se o mais favorável para a produção de celulose (Figura 4.9 e Figura 4.10). A produção máxima de celulose obtida foi de $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, quando o volume de meio de cultivo utilizado foi igual a 40 ml (Tabela 4.2). No entanto, com relação à formação da estrutura HCB-3D (tipo “cocoon”) o ensaio a 3,3 Hz mostrou-se mais favorável. Neste ensaio apenas o volume de 60 ml não formou a estrutura HCB-3D (tipo “cocoon”); os demais formaram estruturas densas, conforme pode ser observado na Figura 4.8d.

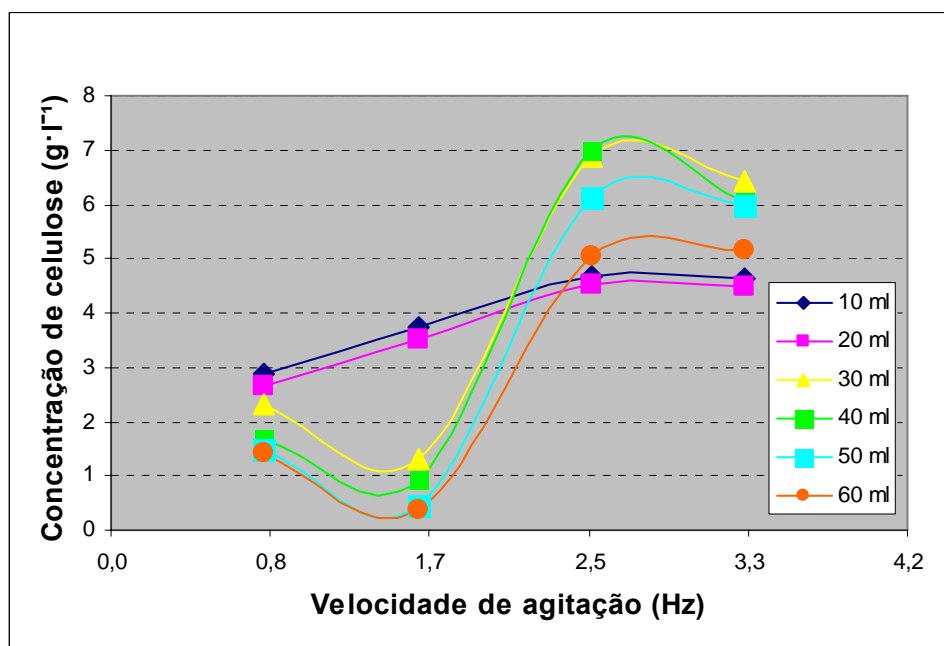


Figura 4.9 – (a) Massa seca de celulose em função da velocidade de agitação e do volume do meio de cultivo.

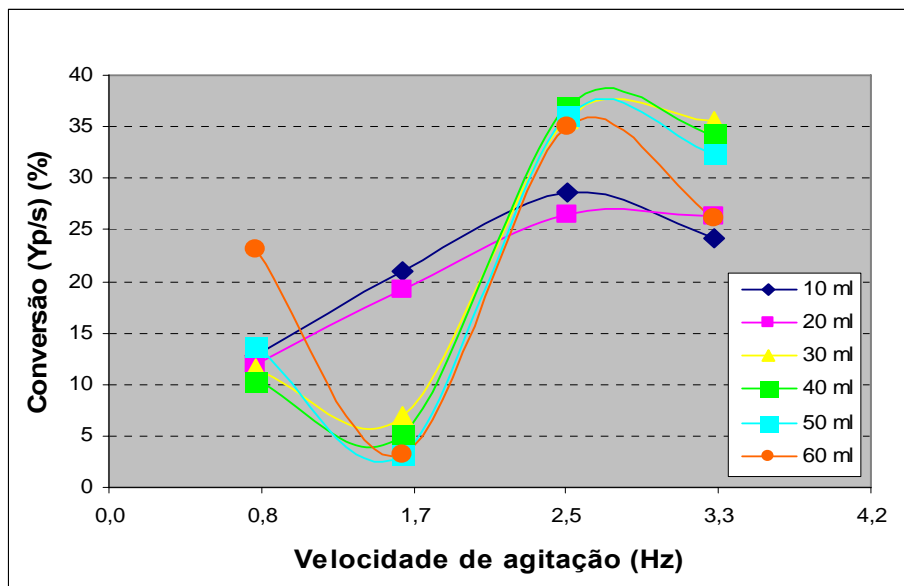


Figura 4.10 - Conversão do substrato em celulose.

4.3.7 Caracterização dos corpos HCB-3D

4.3.7.1 Morfologia

A Figura 4.11 mostra uma micrografia de MEV de uma estrutura HCB-3D sem o tratamento de purificação. Pode-se observar que bactérias se encontram emaranhadas na rede de fibras.

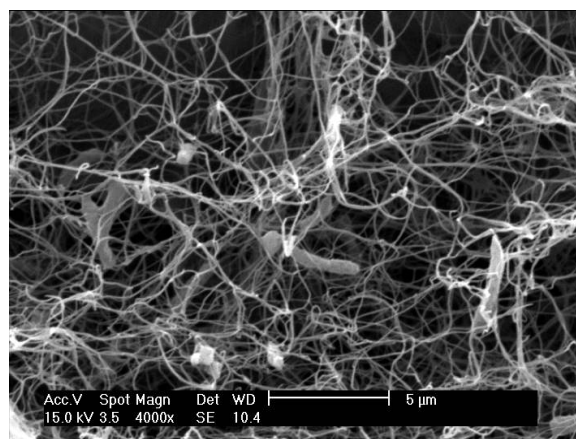


Figura 4.11 - Micrografias do MEV de amostra de HCB-3D liofilizada, sem o tratamento de purificação; ampliação 4000×. Podem ser observados bastonetes bacterianos entre as fibras de celulose.

A Figura 4.12 mostra uma seqüência de micrografias obtidas de observações de MEV de uma amostra da estrutura HCB-3D liofilizadas. Observa-se na Figura 4.12a que, próximo à superfície externa, há um achatamento da estrutura fibrosa, formando multicamadas hierarquicamente arranjadas em células unitárias, aparentemente hexagonais. Essas células formam uma espécie de *honeycomb* (favos-de-mel) que se estendem como tubos na direção perpendicular ao corte da micrografia. Este arranjo peculiar pode ser atribuído, em princípio, ao movimento das células bacterianas durante a síntese de celulose. Em vídeo mostrando o movimento da bactéria *G. xylinus* durante a síntese de celulose, observa-se que esse movimento pode acontecer de forma linear ou em círculos (Brown Jr., 1998b). Isto explicaria a estrutura formada por túneis de formato sextavado observados por MEV. Na natureza encontram-se inúmeros exemplos de estrutura celulares com seção transversal hexagonal. A colméia de abelhas é um exemplo clássico. A estrutura hexagonal minimiza o volume de cera utilizado na construção dos favos para uma determinada espessura da parede da estrutura hexagonal.

Observa-se que a estrutura formada por *G. hansenii* é constituída de nanofibras de celulose, com diâmetro médio das fibras em torno de 100 nm, formando uma rede entrelaçada. Observa-se também na seqüência de micrografias da Figura 4.12, que na superfície da estrutura 3D se concentram o maior número de fibras. Acredita-se que a maior densidade de fibras na superfície esteja relacionada à maior densidade bacteriana nos limites dos corpos 3D. Inicialmente são poucas as células a sintetizar celulose de forma isolada, como foi observado na evolução da produção da estrutura 3D de CB (Figura 4.6). Num segundo momento, estes pequenos corpos isolados se aglomeram, possivelmente em função da interação da celulose e as moléculas de água e impostas pelas condições hidrodinâmicas do método de cultivo. A massa gelatinosa continua aumentando e o volume de bactérias também. Como as bactérias são estritamente aeróbicas, necessitam de maior acessibilidade ao oxigênio, portanto migram para a superfície líquido-ar.

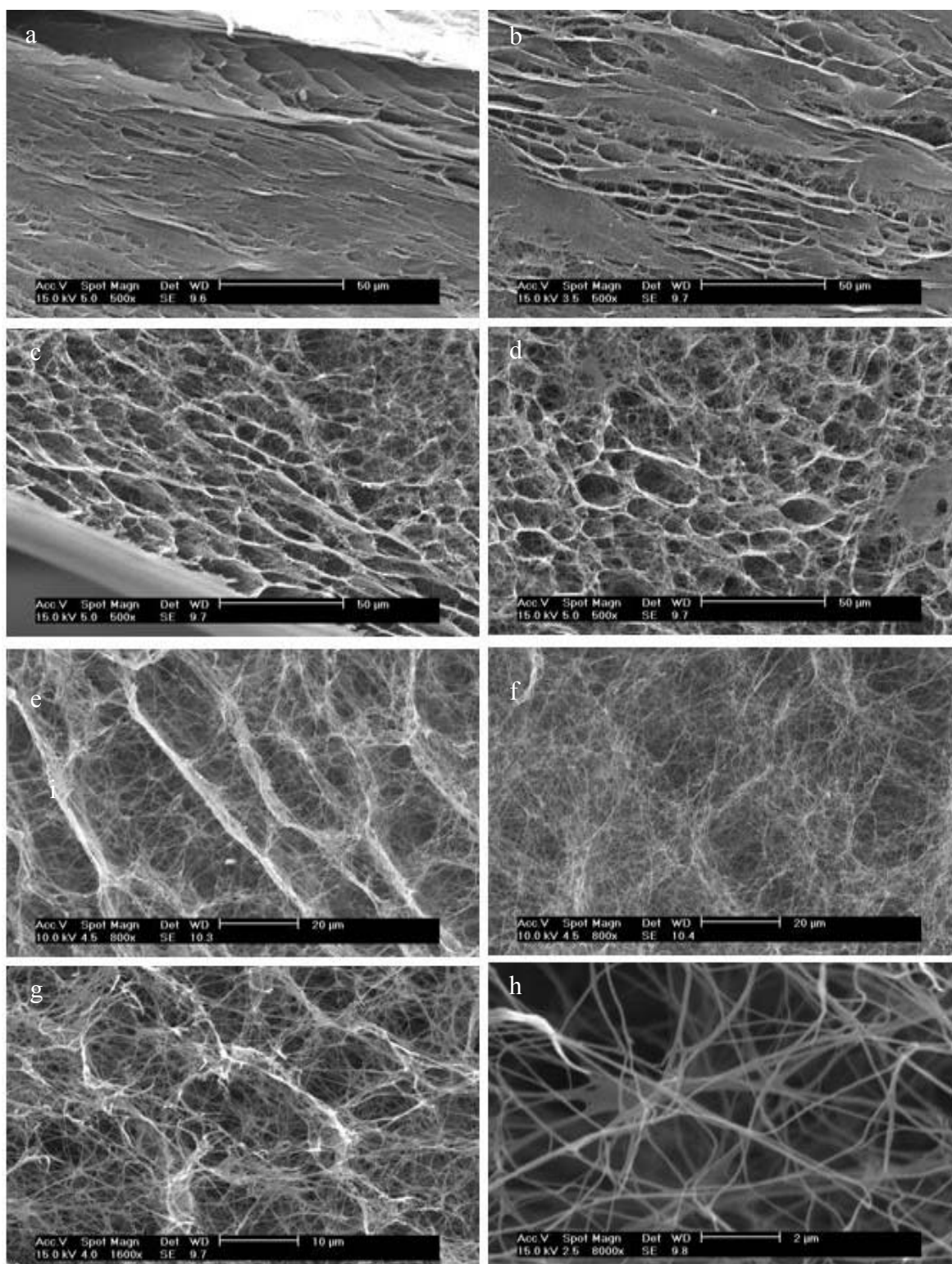


Figura 4.12 - Micrografias do MEV de amostras de CB-3D liofilizada produzidas por *G. hanseni*. Em (a), (b), (c), (d), (f), (g) e (h) corte transversal. Em (e) corte longitudinal. Ampliações: (a), (b), (c) e (d) 600×, (e) e (f) 800×, (g) 1600×, (h) 8000×.

Isso poderia explicar a razão pela qual o interior da estrutura é constituído por poucas fibras de celulose e na superfície a densidade de fibras é nitidamente maior. Estudo realizado por Borzani e De Souza (1995) mostraram que a película que se forma durante o cultivo em condições estáticas cresce no sentido película-ar e não no sentido película-meio de cultivo.

Na Figura 4.13 é mostrada a morfologia da microestrutura da superfície e da região seccionada da estrutura de HCB-3D. A Figura 4.13a apresenta a microestrutura da superfície observada no MEV, a Figura 4.13b mostra uma fotografia de uma estrutura HCB-3D seccionada e a Figura 4.13c mostra a microestrutura da vista lateral de HCB-3D observada no MEV.

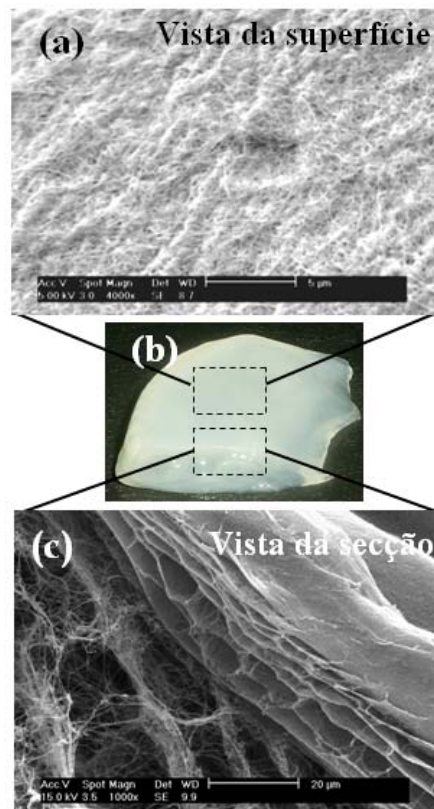


Figura 4.13 - Morfologia da superfície e da região seccionada de uma estrutura HCB-3D observadas no MEV. (a) microestrutura da superfície. (b) fotografia de uma estrutura HCB-3D seccionada. (c) microestrutura da vista de um corte transversal. Ampliação 4000× e 1000×.

4.3.7.2 Conteúdo de água nos hidrogéis

A estrutura peculiar da CB, constituída por uma rede de nanofibras, apresenta grande capacidade de reter água, cerca de 99% da sua massa é água.

O conteúdo de água nos corpos HCB-3D e nas membranas HCB-M foi determinado considerando a massa das amostras na forma de hidrogel com relação à massa das amostras secas. Conforme mostra a Figura 4.14 os corpos HCB-3D possuem maior quantidade de água que as membranas HCB-M. Na Figura 4.5, que mostra a estrutura HCB-3D seccionada, pode ser observado que o interior dos corpos 3D é constituído por uma massa mais gelatinosa que a superfície, e conseqüentemente, com maior conteúdo de água.

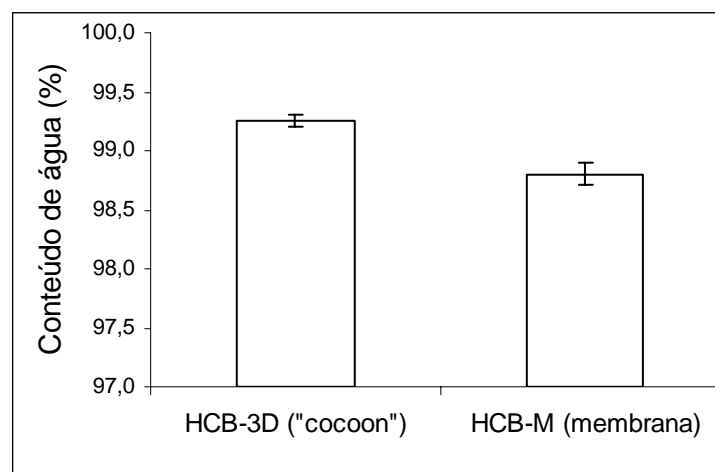


Figura 4.14 - Conteúdo de água nos corpos HCB-3D e nas membranas HCB-M.

4.3.7.3 Reidratação da CB

A capacidade de absorção de água das amostras HCB-M foi maior do que das amostras HCB-3D. As amostras HCB-M recuperaram cerca de 80% da sua massa seca em 96h de imersão em água, já as amostras de HCB-3D recuperaram cerca de 70%.

A Figura 4.15 mostra que o processo de reidratação não recupera o nível de água original (cerca de 99% de água). Isso indica que a capacidade de absorção de água foi parcialmente perdida com o processo de secagem em estufa a 50°C. Isto pode ter provocado um colapso dos poros interfibras, com conseqüente densificação da estrutura celular, reduzindo dessa forma a capacidade de reidratação.

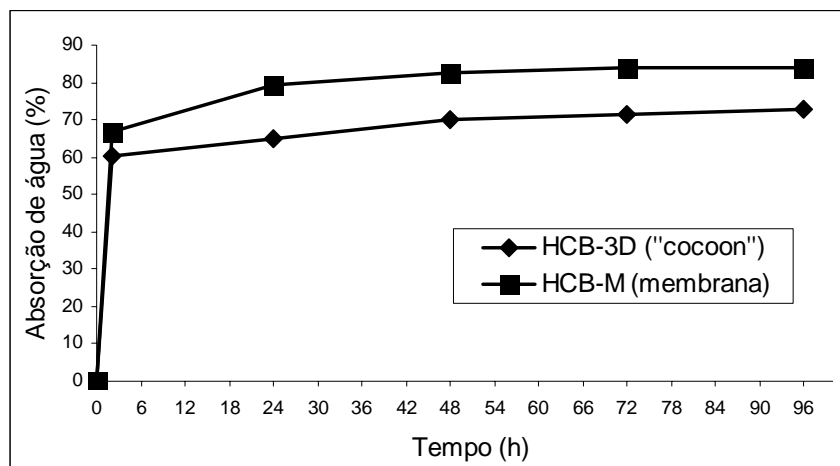


Figura 4.15 – Reidratação dos corpos HCB-3D e das membranas HCB-M.

A capacidade de absorção de água é uma propriedade importante para materiais de utilidade na área médica. A absorção de água na celulose ocorre pela perda das ligações friccionais entre as fibras, causando seu deslocamento (Mantanis *et al.*, 1995). O deslocamento das fibras provoca aumento dos espaços livres permitindo a absorção da água ou de líquidos. A expansão máxima das fibras depende da habilidade da água ou dos líquidos de formarem ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila da celulose (Mantanis *et al.*, 1995).

4.3.7.4 Difração de raios X

Para verificar se a agitação provocou alterações nas características estruturais de HCB-3D, realizou-se análises de difração de raios X. A Figura 4.16 apresenta os difratogramas de raios X de amostras da superfície das estruturas de HCB-3D

produzidas sob condições agitadas e de amostras da superfície das membranas HCB-M produzidas sob condições estáticas.

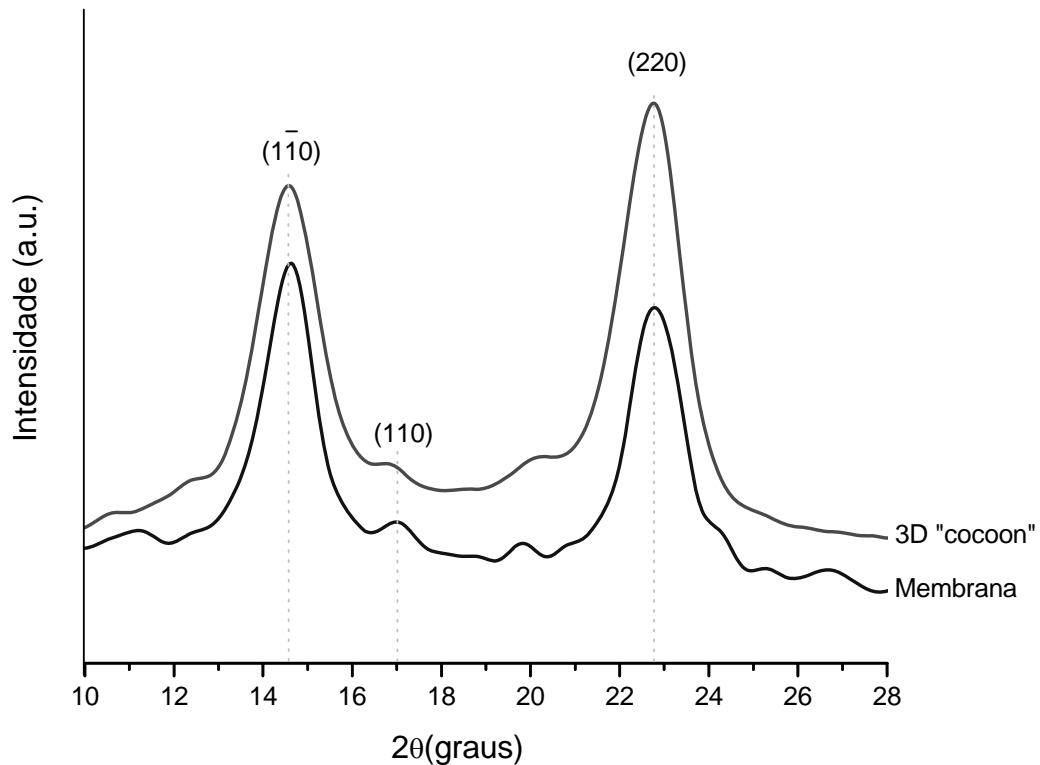


Figura 4.16 - Padrões de difração de raios X obtidos de amostras de HCB-3D. (a) amostras de HCB-3D e (b) amostras de HCB-M. Os planos de reflexão ($1\bar{1}0$, 110 e 200) são característicos de celulose tipo I.

Os três principais picos característicos, atribuídos aos planos de reflexão ($1\bar{1}0$), (110) e (200) de celulose tipo I podem ser identificados em ambos os espectros. Eles são aparentemente similares, porém, pode ser observada leve alteração de deslocamento no ângulo do plano de reflexão ($1\bar{1}0$). Observa-se ainda diferença com relação à intensidade do plano de reflexão (110) entre os dois espectros. Estas diferenças indicam que o modo de cultivo provocou alterações na estrutura cristalina. O grau de cristalinidade, estimado a partir do difratograma, para a HCB-3D foi de $58\pm 5\%$ e para HCB-M foi de $56\pm 5\%$.

4.3.7.5 Resistência à tração

A Figura 4.17 mostra uma curva típica de tensão-deformação de amostras de HCB-3D e de HCB-M como resposta a uma força de tração. As estruturas HCB-3D apresentaram baixo nível de deformação sob força de tração e a ruptura ocorreu com uma deformação de 1,2%. Isso indica que o material é extremamente rígido e apresenta pouca elasticidade. A tensão de ruptura foi de 120 MPa.

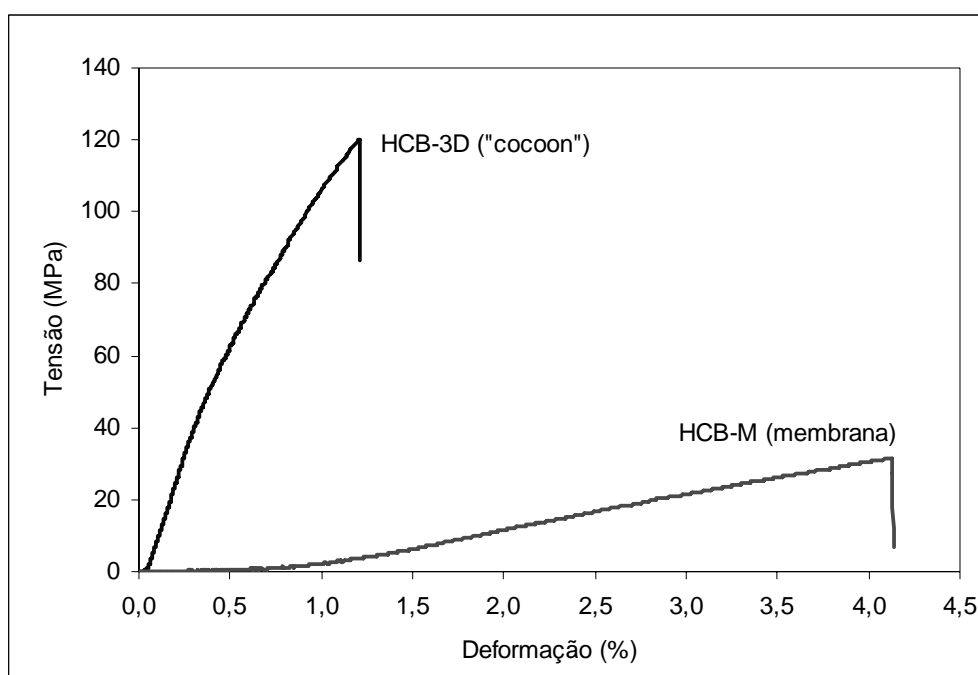


Figura 4.17 - Curva tensão-deformação da estrutura HCB-3D e de HCB-M sob força de tração.

Já as amostras de HCB-M apresentaram nível de deformação maior e tensão de ruptura menor. Elas romperam sob tensão de 32 MPa com uma deformação correspondente de 4,13%, apresentando, assim, uma menor elasticidade que é indicado pela inclinação das curvas tensão-deformação.

4.4 Conclusões

A determinação da via de biossíntese de celulose por *G. hansenii* a partir de manitol como fonte de carbono foi analisada tomando-se por base dados publicados na literatura. Foi realizada a demonstração experimental da produção de celulose por *G. hansenii* em cultura agitada e utilizando manitol como fonte de carbono.

Estruturas 3D macroscópicas de CB em forma de hidrogel, com dimensões centimétricas e decimétricas, foram obtidas pelo cultivo de *G. hansenii* em agitador orbital, utilizando manitol como fonte de carbono, obtendo-se uma concentração máxima de celulose de 7 g·l⁻¹.

Não foi observada instabilidade bacteriana no sentido de se tornarem bactérias não produtoras de celulose quando foram transferidas para culturas agitadas. Pode-se inferir que o manitol é favorável à estabilidade do cultivo, similar à adição de etanol.

A velocidade de agitação e a razão entre volume do frasco e o volume do meio de cultivo influenciam na formação das estruturas HCB-3D e na produção de celulose. As condições mais favoráveis foram velocidade de agitação igual a 2,5 Hz e volume do frasco e volume do meio de cultivo na relação 2,5:1.

A microestrutura interna dos corpos tridimensionais é constituída por uma estrutura celular do tipo “*honeycombs*”, similar a diversas estruturas encontradas na natureza. Essa estrutura hexagonal se estabelece como uma forma de otimizar o volume e minimizar a energia necessárias para a formação do hidrogel.

Sugere-se que os corpos de hidrogel produzidos possuem características físico-químicas apropriadas para aplicação como material de implantes de preenchimento, próteses de tecido cartilaginoso e ósseo, e arcabouços para engenharia de tecidos e órgãos. Opcionalmente, essas estruturas podem ser

utilizadas para liberação controlada de fármacos, quando devidamente incorporados às estruturas fibrosas.

Capítulo 5

**Corpos Tridimensionais de Hidrogel de
Celulose Bacteriana Vascularizados**

Resumo

Corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana vascularizados (HCB-3D-VAS) foram produzidos a partir do cultivo da bactéria *G. hansenii*, em sistema de cultivo agitado e utilizando-se moldes para a formação de canais de vascularização. Estes corpos macroscópicos vascularizados, com geometria esférica, elipsóide ou ovóide, são compostos de uma massa gelatinosa envolvida por uma membrana gelatinosa, densa e lisa, com canais internos que podem simular vasos sanguíneos, também revestidos por uma membrana similar. A análise da microestrutura destes corpos por MEV revelou nanofibras celulósicas dispersas aleatoriamente e tridimensionalmente. O biomaterial produzido pode ser útil como uma plataforma de testes e diagnóstico de resposta celular (por exemplo, endotelial e muscular lisa) a lesões causadas pelo implante de endopróteses vasculares (*stents*), etc, e como uma plataforma terapêutica tridimensional para o crescimento de células específicas que podem eventualmente substituir tecidos lesados e/ou órgãos deficientes.

5.1. Introdução

Os biomateriais e os *scaffolds* realizam um papel essencial na engenharia de tecidos, dirigindo o crescimento celular tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Griffith e Naughton, 2002; Drotleff *et al.*, 2004). Aplicações mais avançadas demandam melhor controle de propriedades estruturais dos materiais, tais como taxa de degradação, e propriedades de superfície relacionadas ao controle das interações que permitem a análise quantitativa de processos celulares envolvidos em regeneração tecidual.

As propriedades requeridas desses biomateriais dependem de sua composição e estrutura molecular (Gunatillake *et al.*, 2006). A celulose bacteriana, poli-(hidroxialcanoatos), quitosana, poliacrilatos, álcool polivinílico e silicones são polímeros que atualmente têm sido muito estudados para aplicações que envolvem o desenvolvimento de novos biomateriais compósitos visando sua utilização na área médica e em especial na engenharia de tecidos (Valenta e Auner, 2004).

Os polímeros orgânicos têm encontrado muitas aplicações em todas as áreas da medicina, desde simples dispositivos extracorporais até materiais sofisticados para implantes (Velema e Kaplan, 2006).

A celulose produzida por bactérias que é constituída por uma rede de nanofibras com propriedades similares às fibras de colágeno é um material extremamente versátil, devido às suas propriedades de absorção de líquidos, alto grau de pureza, cristalinidade, flexibilidade e moldabilidade (Bodin *et al.*, 2007).

A avaliação *in vivo* da biocompatibilidade da CB mostrou que ela possui excelente integração com o tecido vivo e não apresenta reação inflamatória crônicas (Helenius *et al.*, 2006). Culturas de células musculares lisas utilizando CB como *scaffolds* mostraram que estas se aderem e se proliferam permitindo a formação de uma camada confluenta no lado luminal dos canais de CB (Backdahl *et al.*, 2006).

Klemm e colaboradores (2006) estudaram a aplicação de microvasos de CB como material de implante para artéria carótida de ratos. Após quatro semanas da implantação a superfície interna dos microvasos e região de sutura com a artéria carótida dissecada foram recobertas completamente por uma camada de células endoteliais. Os resultados das investigações experimentais de um ano confirmam os estudos realizados durante quatro semanas. A homogeneidade e a capacidade de ancoragem da neo-íntima correspondem a vaso sanguíneo de artéria carotídea de rato. Fibroblastos penetraram na rede celulósica e desta maneira ancoraram-se

na prótese artificial. O colágeno detectado confirmou a presença de fibroblasto aumentando integração com o implante. As células endoteliais assumiram sua completa função na neo-íntima. Os resultados demonstraram um processo de integração sem degradação (Klemm *et al.*, 2001; Klemm *et al.*, 2006).

Avanços recentes têm sido feitos por pesquisadores brasileiros na síntese e aplicação de CB, especialmente na aplicação de materiais celulósicos em recuperação de pele e no revestimento de *stents* (Mello *et al.*, 2001; Ereno, 2004; Porto *et al.*, 2008; Rambo *et al.*, 2008; Recouvreux *et al.*, 2008).

Um aspecto crítico da produção de estruturas tridimensionais para uso como *scaffolds* é a necessidade de vasos que possam conduzir no interior do novo tecido os nutrientes celulares e o oxigênio necessários para a viabilidade celular.

A doença arterial coronariana em suas diversas manifestações crônicas ou agudas tem se tornado a causa mais comum de mortalidade no Brasil e no mundo industrializado. O impacto econômico e social da doença arterial coronariana é alto. Mundialmente milhões de pessoas apresentam um evento cardíaco agudo por ano. A angioplastia coronária transluminal percutânea é amplamente utilizada para tratar a estenose coronária sintomática severa (isto é, o estreitamento e eventual entupimento do lúmen do vaso sangüíneo). Um grande avanço neste procedimento resultou da criação de um dispositivo mecânico, o *stent* ou endoprótese coronária, destinado a sustentar internamente a artéria coronária (Garas *et al.*, 2001).

A restenose de artérias submetidas à implantação de *stents* tem sido a grande preocupação na prática da angioplastia. Os *stents* eluidores de fármacos (revestidos com polímeros que liberam fármacos) reduzem muito os riscos da restenose quando comparados com os *stents* convencionais não revestidos. Deste modo, os *stents* eluidores de fármacos revolucionaram a terapia de revascularização e estão transformando-se rapidamente no padrão para a prática da intervenção coronária percutânea (angioplastia coronária) (Yang *et al.*, 2008;

Lanzer *et al.*, 2008). Os fármacos com ação antiproliferativas, antitrombóticas, antiinflamatórias e pró-endoteliais são adicionados à superfície dos *stents* ou incorporados em matrizes poliméricas que revestem os *stents*. Dessa forma, o próprio *stent* é utilizado como meio para liberação destes fármacos (Lanzer *et al.*, 2008).

Usualmente os testes pré-clínicos desses dispositivos envolvem animais de pequeno e grande porte (ratos, coelhos, cães, porcos, etc.), o que é indesejável do ponto de vista bioético e econômico. Sistemas que imitam propriedades extracelulares permitem a avaliação da eluição desses agentes bioativos na corrente sanguínea e sua ação nas células-alvo.

Um dos grandes desafios da engenharia de tecidos moderna é o desenvolvimento de materiais com estruturas tridimensionais capazes de suportar culturas celulares.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi produzir estruturas tridimensionais de celulose bacteriana vascularizadas para serem utilizadas na construção de uma plataforma de testes e diagnósticos de resposta celular, por exemplo, para avaliação de respostas a lesões causadas por implantes de endopróteses vasculares (*stents*) e como uma possível plataforma terapêutica celular.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 *Produção dos corpos tridimensionais de hidrogel de celulose bacteriana vascularizados (HCB-3D-VAS)*

O microrganismo utilizado e modo de preparação do inóculo para os experimentos seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.2 do capítulo 3.

5.2.1.1 Meio e condições de cultivo

Os experimentos foram realizados com meio de cultivo sob agitação, em frascos Erlenmeyer de 250 ml e com volume do meio de 50 ml. A composição e o preparo do meio de cultivo seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.2. A esterilização do meio de cultivo seguiu o procedimento descrito no item 3.2.

Para produzir as vascularizações foram imersos no meio de cultivo fios de Nylon® ou tubos de silicone de diâmetros que variaram entre 0,5 mm e 5 mm, que serviram de molde para produzir as vascularizações. Os frascos contendo o meio de cultivo e os moldes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Ao meio de cultivo esterilizado e resfriado até atingir a temperatura de 30°C foi adicionado 5% (v/v) do inóculo preparado previamente e mantido em agitador orbital a 2,5 Hz, 30°C, durante 14 dias. Os corpos tridimensionais gelatinosos coletados do meio de cultivo foram submetidos ao tratamento de purificação já descrito no item 3.2.

5.2.2 Caracterização dos corpos HCB-3D-VAS

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.2.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Produção dos corpos HCB-3D-VAS

A Figura 5.1 mostra um diagrama esquemático da estrutura HCB-3D-VAS, em analogia à anatomia de vasos sanguíneos. Separada pelas membranas interna

(túnica íntima) e externa (túnica adventícia) está uma camada interna (túnica média).

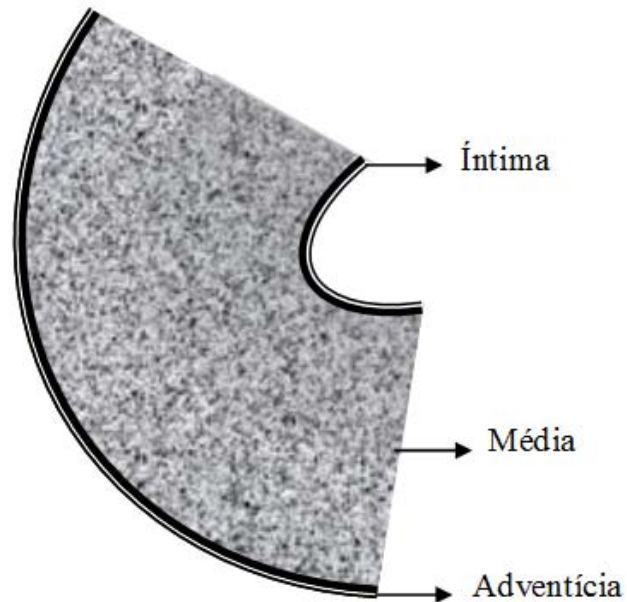


Figura 5.1 - Diagrama esquemático da estrutura HCB-3D-VAS.

A Figura 5.2a mostra uma vista do corte longitudinal e a Figura 5.2b vista do corte transversal. Como pode ser observado o corpo de HCB-3D-VAS é revestido por uma membrana densa de hidrogel de celulose e preenchido interiormente por uma camada gelatinosa também de hidrogel de celulose. Os canais formados também são revestidos por uma membrana densa e lisa.

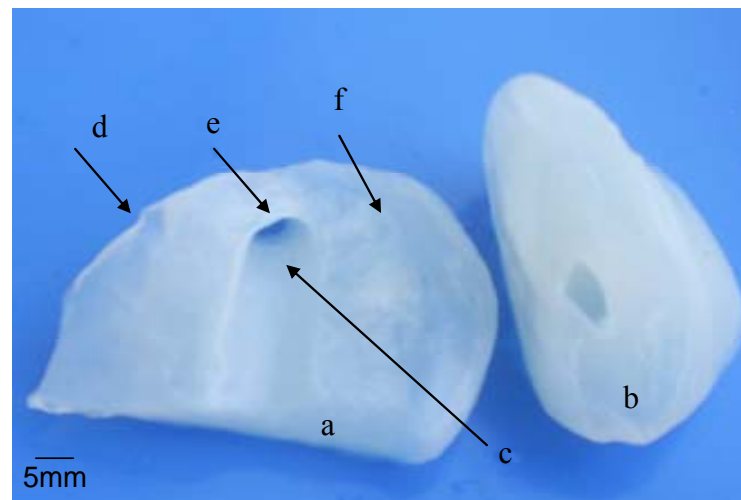


Figura 5.2 - Estrutura de HCB-3D-VAS seccionada com as seguintes dimensões no estado hidrogel: eixo maior = 80 mm; eixo menor = 50 mm, altura = 25 mm. (a) vista do corte longitudinal; (b) vista do corte transversal; (c) canal com diâmetro de 5 mm; (d) membrana densa que reveste externamente a estrutura; membrana densa que reveste o canal; (f) massa gelatinosa que constitui o interior da estrutura.

O baixo grau de rugosidade é uma característica importante para evitar a trombose (Klemm *et al.*, 2001), por exemplo no caso de implante de *stents* farmacológicos. Estudos realizados por Klemm e colaboradores (2006) demonstraram que o grau de rugosidade da CB na forma de hidrogel é comparável aos vasos sanguíneos de ratos. Baseando-se nessas informações, e considerando que a superfície que reveste os canais dos corpos HCB-3D-VAS é constituída de hidrogel de CB, pode-se concluir que as mesmas também possuem baixo grau de rugosidade. Os corpos de HCB-3D-VAS armazenam mais de 99% de água na sua rede de nanofibras. A água armazenada, além de estabilizar a rede de nanofibras de celulose por formar ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular, também contribui para a biocompatibilidade com tecidos em geral e em particular o sangue. A estrutura porosa da rede de nanofibras de celulose permite a fluxo de água, íons monovalentes e pequenas moléculas, mas bloqueia a passagem de biopolímeros e corpúsculos constituintes do sangue (Klemm *et al.*, 2006).

5.3.2 Formação dos corpos HCB-3D

A formação dos corpos tridimensionais de HCB-3D-VAS é mostrada na seqüência de fotos da Figura 5.3. Estão sendo mostrados dois tipos de moldes utilizados para a formação de canais da estruturas 3D. Na Figura 5.3a utilizou-se 4 fios de Nylon® de 1 mm de espessura e 50 mm de comprimento e na Figura 5.3d utilizou-se um fio de Nylon® de 1 mm de espessura e 200 mm de comprimento modelado em várias voltas. Na Figura 5.3a e c, decorrido dois dias de cultivo observa-se o recobrimento dos fios por uma camada de celulose. Na Figura 5.3b, após cinco dias de cultivo observa-se a formação de uma estrutura 3D gelatinosa envolvendo os fios. Após oito dias a estrutura gelatinosa tornou-se mais densa e com uma membrana envolvendo-a (Figura 5.3c e Figura 5.3e). O estudo realizado sobre a dinâmica da formação da estrutura HCD-3D realizado no capítulo 4, mostrou que ocorre aumento da massa de hidrogel até o 13º dia de cultivo.

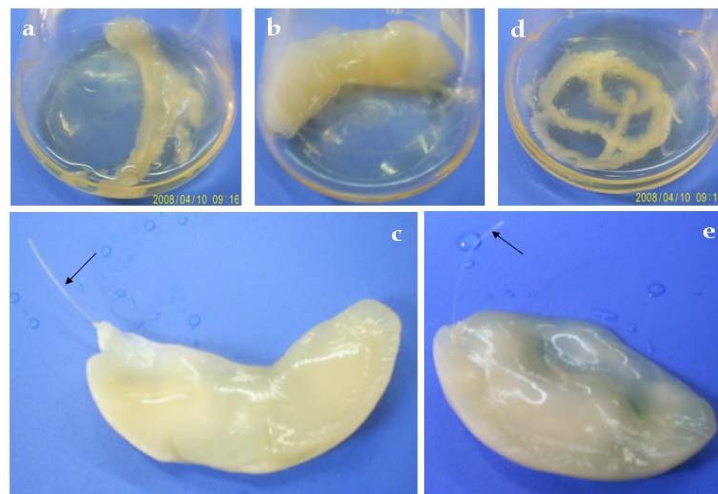


Figura 5.3 - Formação dos corpos HCD-3D-VAS. (a), (b) e (c) mostram a formação dos corpos, decorridos 2, 5 e 8 dias, respectivamente. (d) e (e) decorridos 2 e 8 dias, respectivamente. A diferença entre a formação das duas estruturas refere-se ao diâmetro dos fios utilizados e a forma como foram dispostos no frasco. As setas em (c) e (e) mostram o fio utilizado como molde para a formação do vaso.

5.3.3 Morfologia da microestrutura dos corpos HCB-3D-VAS

A engenharia de tecidos busca basicamente reparar, substituir ou restaurar a função do tecido doente ou danificado combinando biomateriais e células. As propriedades do tecido produzido sinteticamente dependem da resposta das células ao microambiente 3D. Conseqüentemente o microambiente 3D é muito importante para recriar componentes estruturais e bioquímicos de microambiente celular *in vivo* (Tsang e Bhatia, 2004). O método tradicional para controlar a microarquitetura do biomaterial arcabouço envolve a construção de arcabouço polimérico poroso como substrato para as células aderirem (Langer e Vacanti, 1993). Uma abordagem para aumentar a funcionalidade do tecido construído tem sido imitar a micro arquitetura do tecido e o microambiente em torno das células no corpo (Tsang e Bhatia, 2004). O biomaterial hidrogel possui grande potencial para as aplicações de engenharia de tecidos devido ao elevado conteúdo de água e suas propriedades mecânicas similares as do tecido no corpo (Fedorovich *et al.*, 2007).

A Figura 5.4 mostra micrografias detalhadas de MEV de um vaso nesta HCB-3D-VAS. Observa-se que o vaso produzido possui um diâmetro de aproximadamente 5 mm. As micrografias foram obtidas do material liofilizado. Este tipo de material, quando na forma de hidrogel, apresenta uma superfície lisa, com baixo grau de rugosidade. Klemm e colaboradores (2006) analisaram o grau de rugosidade da superfície de vasos sanguíneos artificiais de CB e encontraram que eles são comparáveis à artéria de rato (Klemm *et al.*, 2006).

As Figura 5.4c-f apresentam detalhes da parede do canal produzido. Observa-se que a parede interna do canal é significativamente mais densa que a sua superfície externa. Detalhes da microestrutura são observados nas micrografias das Figura 5.4g e h. Observa-se que a parede densa (membrana que apresenta uma densidade maior de fibras, ou menor porosidade interfibras) que forma o canal possui uma espessura, que pode ser considerada constante ao redor

do canal, em torno de 5 μm . A densidade das fibras que compõem a membrana não diminui gradativamente no sentido radial em relação ao canal, ou seja, não há um gradiente radial na densidade de fibras.

A Figura 5.5 detalha um vaso produzido na estrutura de HCB-3D-VAS. A Figura 5.5a mostra a microestrutura de um vaso da estrutura de HCB-3D-VAS observado por MEV, a Figura 5.5b mostra uma fotografia de uma estrutura HCB-3D-VAS seccionada e a Figura 5.5c mostra uma micrografia ampliada da microestrutura de um vaso da estrutura de HCB-3D-VAS, detalhando a membrana que reveste o vaso e a região que o sobrepõe. Observe que é possível fazer analogia dos vasos produzidos nas estruturas HCB-3D-VAS (Figura 5.5c) com as camadas constituintes dos vasos sanguíneos (Figura 5.1).

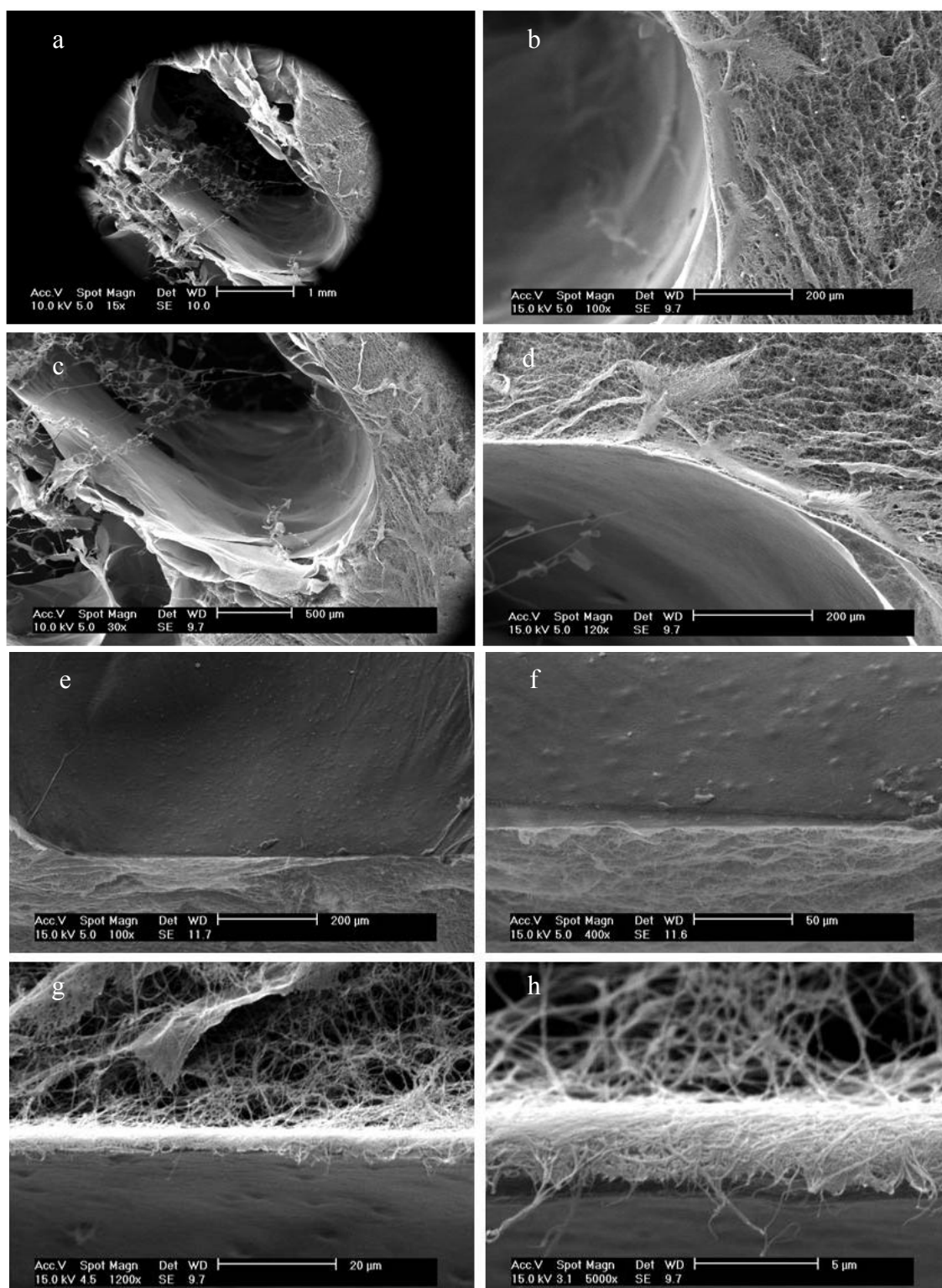


Figura 5.4 - Micrografias de MEV de um vaso produzido na estrutura HCB-3D-VAS. De (a) a (f) detalham a superfície do vaso e da região que o sobrepõe. Ampliações: (a) 15 \times , (b) 100 \times , (c) 30 \times , (d) 120 \times , (e) 100 \times , (f) 400 \times , (g) 1200 \times , (h) 5000 \times .

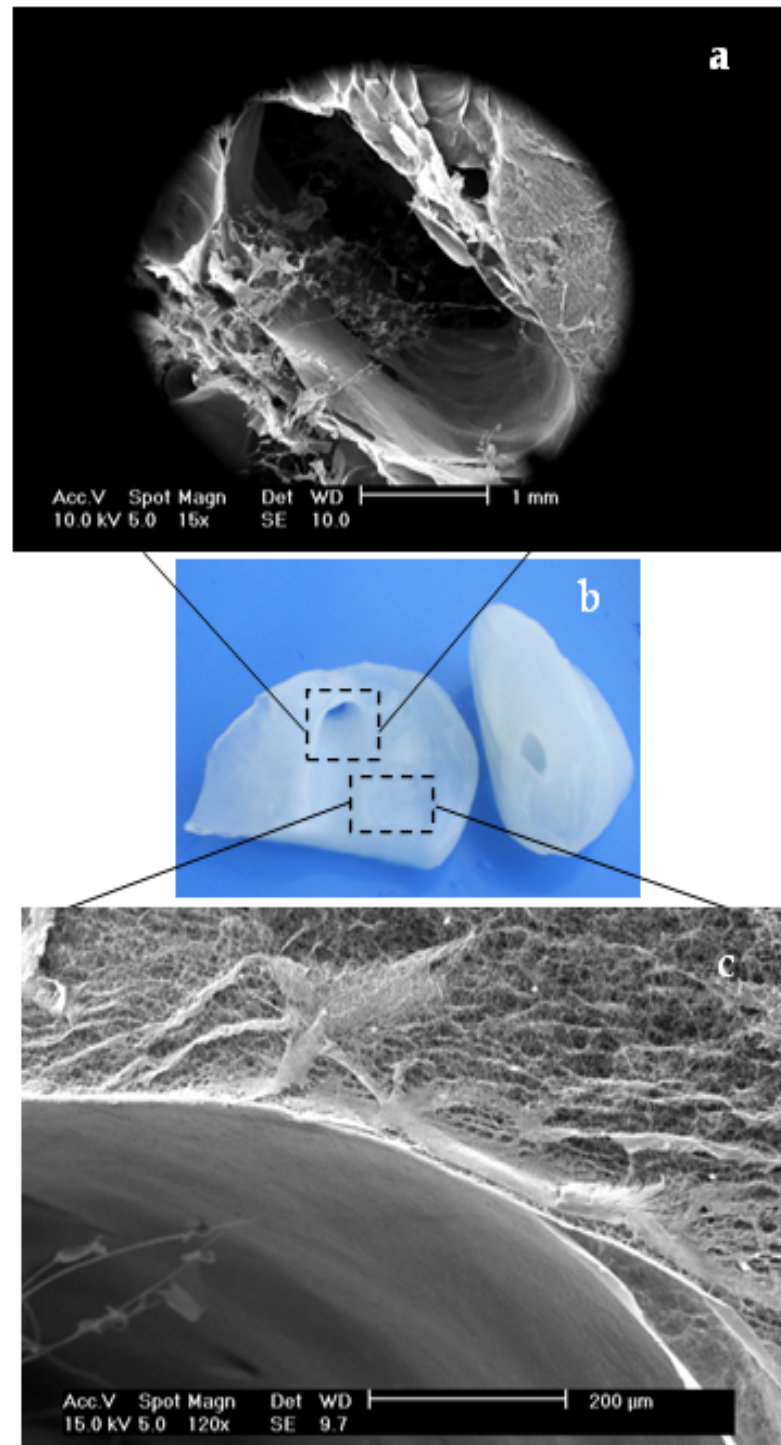


Figura 5.5 - Morfologia da superfície e da região seccionada de uma estrutura HCB-3D-VAS, observado no MEV. (a) canal produzido na estrutura. (b) fotografia de uma estrutura de HCB-3D-VAS seccionada longitudinalmente e transversalmente. (c) microestrutura da região que sobrepõe o canal.

5.4 Conclusões

Hidrogéis 3D vascularizados constituídos de nanofibras de celulose bacteriana foram desenvolvidos utilizando moldes adequados (fios de Nylon® e de silicone com diferentes diâmetros) para a formação de canais.

A avaliação da microestrutura mostrou que a superfície dos vasos é constituída por uma densa membrana de nanofibras de celulose entrelaçadas, similar à membrana que reveste externamente a estrutura. A região que sobrepõe os vasos é constituída de uma estrutura celular também de nanofibras de celulose, porém menos densa.

Sugere-se que estas estruturas possuem características físico-químicas apropriadas para aplicação como material para testes e diagnósticos de resposta celular (endotelial e muscular lisa) a lesões causadas por implantes de endopróteses vasculares (*stents*).

Capítulo 6

Compósito Hidrogel de Celulose

Bacteriana-Acemanana

Resumo

Biomaterial compósito baseado em hidrogel de celulose bacteriana (CB) e acemamana (ACE) foi desenvolvido através de cultivo da bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 em meio de cultivo suplementado com acemanana, um polissacarídeo proveniente da planta *Aloe barbadensis* Miller. O biomaterial compósito é constituído por estruturas tridimensionais gelatinosas, compostas por nanofibras de celulose e acemanana dispersas aleatoriamente, conforme observações da microestrutura analisadas por MEV. A cristalinidade do compósito, analisada por difração de raios X, mostrou ser inferior à CB nativa produzida sob as mesmas condições. A análise de amostras do compósito HCB-ACE por FTIR sugere a ocorrência de ligações de hidrogênio intermolecular entre os dois polímeros, e ainda alterações morfológicas com relação à celulose nativa, devido à incorporação da acemanana na rede celulósica. A ocorrência da banda 816 cm^{-1} no espectro HCB-ACE comprova a formação do compósito, uma vez que os picos de absorção característicos de glucomananas encontram na região de 800 a 900 cm^{-1} . O grande diferencial deste biomaterial é a incorporação da acemanana em nanofibras de celulose bacteriana e seu potencial para a aplicação na área médica, em particular na engenharia de tecidos.

6.1 Introdução

A celulose bacteriana pode ser modificada durante e após a sua biossíntese para se obter materiais com estruturas apropriadas para o desenvolvimento de novos tecidos. Modificações da estrutura molecular da CB e de suas propriedades podem ser obtidas durante a sua síntese variando a linhagem bacteriana, ou pela adição de compostos ao meio de cultivo. Compostos solúveis em água adicionados ao meio de cultivo podem alterar a biossíntese da celulose, como também podem

ser incorporados à rede de nanofibras durante o processo de cristalização. Polímeros inseridos no sistema fibras-poros da CB constitui uma maneira apropriada de se obter diferentes tipos de compósitos de nanocelulose formado por uma rede dupla (Kramer *et al.*, 2006). Calcofluor adicionado ao meio de cultivo resulta em celulose de cadeia curta (Haigler *et al.*, 1980). A *N*-acetil-glicosamina produz alteração na formação de CB pela inserção de moléculas de *N*-acetil-glicosamina na cadeia celulósica (Lee, J. W. *et al.*, 2001; Ciechańska, 2004); e carboximetilcelulose e metilcelulose provocam a formação de microfibrilas espaçadas e na modificação da arquitetura da rede (Haigler *et al.*, 1982). As glucomananas também influenciam na formação das fibras de CB de maneira similar a carboximetilcelulose e a metilcelulose (Tokoh *et al.*, 1998). A acemanana, um polissacarídeo extraído da *A. barbadensis*, pode influenciar na formação das fibras da mesma forma que a glucomanana, permitindo assim a obtenção de um compósito constituído de celulose bacteriana e acemanana.

A planta *A. barbadensis* Miller possui propriedades medicinais, tais como estimulante do sistema imune, antiinflamatória e antiviral. A acemanana, fração polissacarídica dessa planta, tem sido utilizada em produtos comerciais que auxiliam na cicatrização de lesões, indicados para o tratamento de ferimentos crônicos e úlceras. Além disso, a acemanana apresenta atividade imunoestimulante, na produção de anticorpos específicos e no aumento da expressão de citocinas, tais como interleucinas I, interleucinas VI e fator de necrose tumoral-alfa (Lee, J. K. *et al.*, 2001), implicando dessa forma no aumento dos fibroblastos em cultura, e no estímulo da atividade fagocítica dos macrófagos (Zhang e Tizard, 1996; Ramamoorthy e Tizard, 1998; Djeraba e Quere, 2000; Lee, J. K. *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 2005). A acemanana é constituída por resíduos de manose e glicose unida por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Femenia *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2004).

Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um hidrogel compósito baseado em celulose bacteriana e acemanana, visando obter um

biomaterial que combine propriedades peculiares da CB com as atividades medicinais da acemanana.

6.2 Materiais e métodos

6.2.1 *Produção do compósito hidrogel tridimensional de celulose bacteriana e acemanana (HCB-ACE)*

O microrganismo e preparação do inóculo para os experimentos seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.

6.2.1.1 *Meio e condições de cultivo*

Os experimentos para a produção do compósito HCB-ACE seguiram as composições do meio de cultivo e condições de cultura descritos no item 4.2. Ao meio de cultivo foram adicionados acemanana nas concentrações de 0 a 1 g·l⁻¹.

Os experimentos foram mantidos em agitador orbital a 2,5 Hz, 30°C, durante 10 dias. As estruturas tridimensionais gelatinosas produzidas foram coletadas e submetidas ao tratamento de purificação, conforme já descrito no item 3.2 do capítulo 3.

6.2.2 *Caracterização do compósito HCB-ACE*

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 4.2.

As análises de difratometria de raios X seguiram os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.

6.2.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As amostras secas e moídas de ACE, HCB-3D e HCB-ACE foram prensadas na forma de pastilha, juntamente com brometo de potássio. Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Bomem modelo ABB FTLA200, na faixa de número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Produção do compósito de HCB-ACE

O cultivo de *G. hansenii* em agitador orbital, utilizando manitol como fonte de carbono e com acemanana em diferentes concentrações, produziu corpos tridimensionais macroscópicos de formatos variados, conforme pode ser observado na Figura 6.1a. As dimensões destas estruturas são dependentes do volume do meio de cultivo, da concentração de acemanana utilizada, e do diâmetro do frasco utilizado para o cultivo. As culturas que foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 1000 ml contendo 150 ml de meio de cultivo e 0,8 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de acemanana produziram estruturas 3D gelatinosas com massa média de aproximadamente 115 g, conforme mostrado na Figura 6.1a. Na Figura 6.1b mostra-se uma estrutura tridimensional produzida sob as mesmas condições, porém sem a adição de acemanana. A massa desta estrutura é de aproximadamente 100 g e ela é mais compacta e densa que a estrutura produzida com a inserção de acemanana ao meio de cultivo.

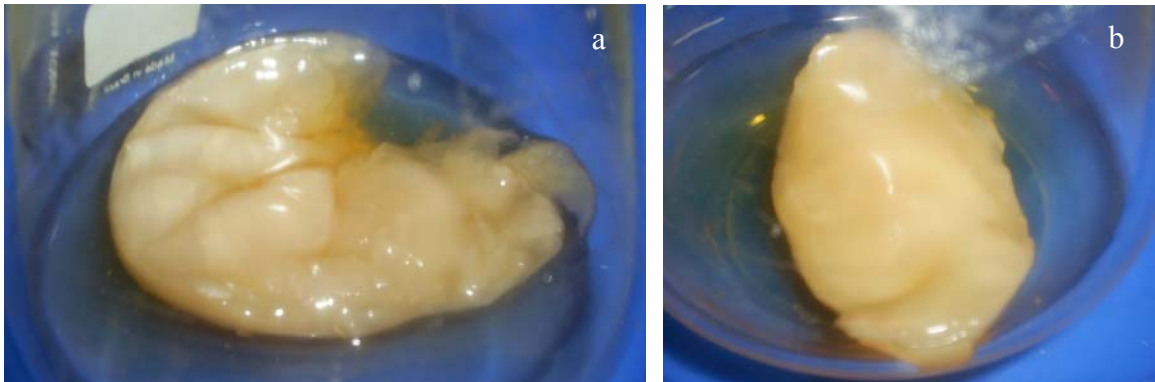


Figura 6.1 - (a) Compósito HCB-ACE (celulose e acemanana), (b) HCB-3D (celulose nativa).

A Figura 6.2 apresenta a produção de HCB-ACE em meio de cultivo contendo acemanana, com as concentrações variando de 0 a 1 g·l⁻¹. A produção HCB-3D sem acemanana foi de 4,63 g·l⁻¹, enquanto que a produção do compósito HCB-ACE foi de 6,64 g·l⁻¹ quando se usou a concentração de acemanana igual a 0,6 g·l⁻¹. Isto sugere que a viscosidade do meio de cultivo, provocada pela adição da acemanana, foi favorável à produção do compósito. Além disso, a acemanana favoreceu a retenção de água na estrutura formada. Como a acemanana é um polímero altamente hidrofílico ela pode ter contribuído para o aumento da retenção de água no compósito. Na Tabela 6.1 é mostrada a massa do compósito HCB-ACE no estado hidratado, a massa seca, e o conteúdo de água.

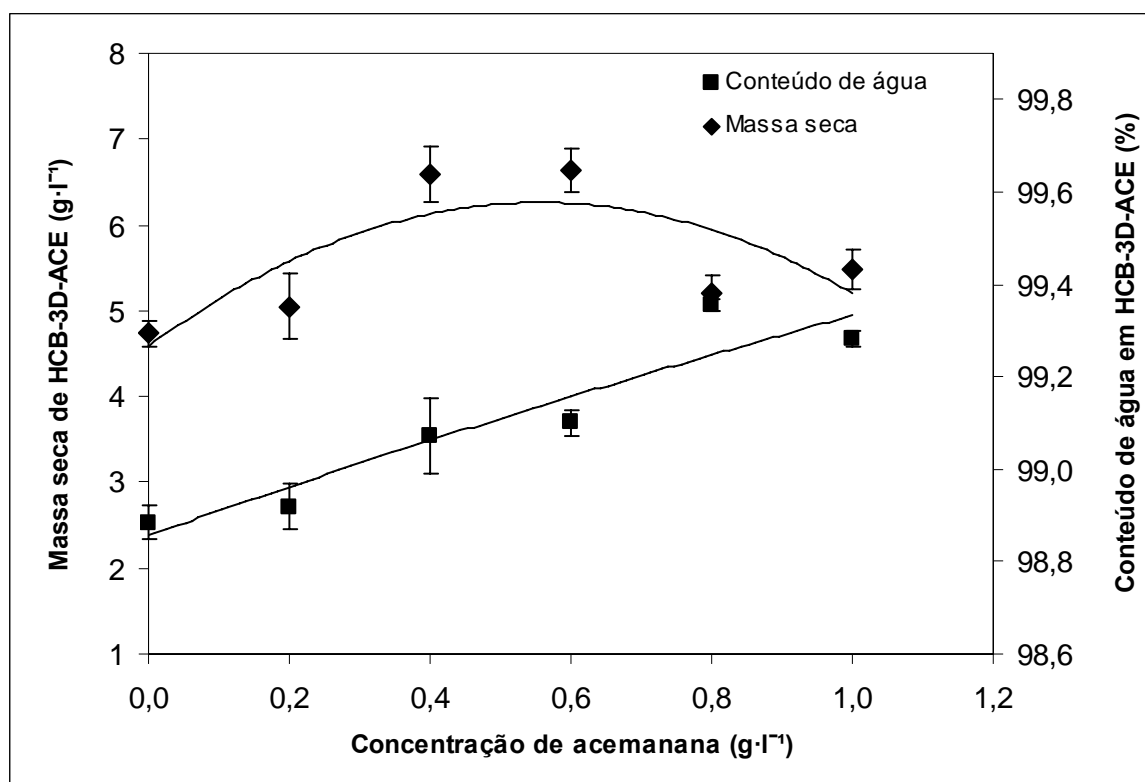


Figura 6.2 – Massa seca e conteúdo de água do composto HCB-ACE em função da concentração de acemanana adicionada ao meio de cultivo.

Tabela 6.1 – Massa úmida, massa seca e conteúdo de água do composto HCB-ACE, utilizando diferentes concentrações de acemanana. Ensaios realizados em triplicata.

Ensaio	Concentração de acemanana (g·l ⁻¹)	Massa úmida (g·l ⁻¹)	Massa seca (g·l ⁻¹)	Conteúdo de água (%)
1	0,0	413,33 ± 0,38	4,63 ± 0,15	98,88 ± 0,04
2	0,2	467,00 ± 1,17	4,98 ± 0,38	98,92 ± 0,05
3	0,4	710,33 ± 1,15	6,59 ± 0,32	99,07 ± 0,08
4	0,6	738,56 ± 0,16	6,64 ± 0,25	99,10 ± 0,03
5	0,8	809,22 ± 1,08	5,87 ± 0,20	99,36 ± 0,01
6	1,0	763,89 ± 0,84	5,82 ± 0,22	99,28 ± 0,02

6.3.2 Formação de HCB-ACE

A evolução da formação do compósito HCB-ACE é mostrada na Figura 6.3. A Figura 6.3a mostra o cultivo de *G. hansenii* ATCC 23769 em condição agitada após o primeiro dia, utilizando manitol como fonte de carbono e a adição de 0,6 g·l⁻¹ de acemanana. Observa-se um meio de cultivo viscoso e filamentos celulósicos dispersos. No segundo dia de cultivo, Figura 6.3b, observa-se que os filamentos se juntaram formando dois corpos gelatinosos. Nos dias subsequentes observa-se que estes corpos gelatinosos foram se juntando numa única estrutura 3D e aumentando de volume. Na Figura 4.6f, correspondente ao décimo dia de cultivo, observou-se que todo meio de cultivo havia sido absorvido pela massa celulósica.

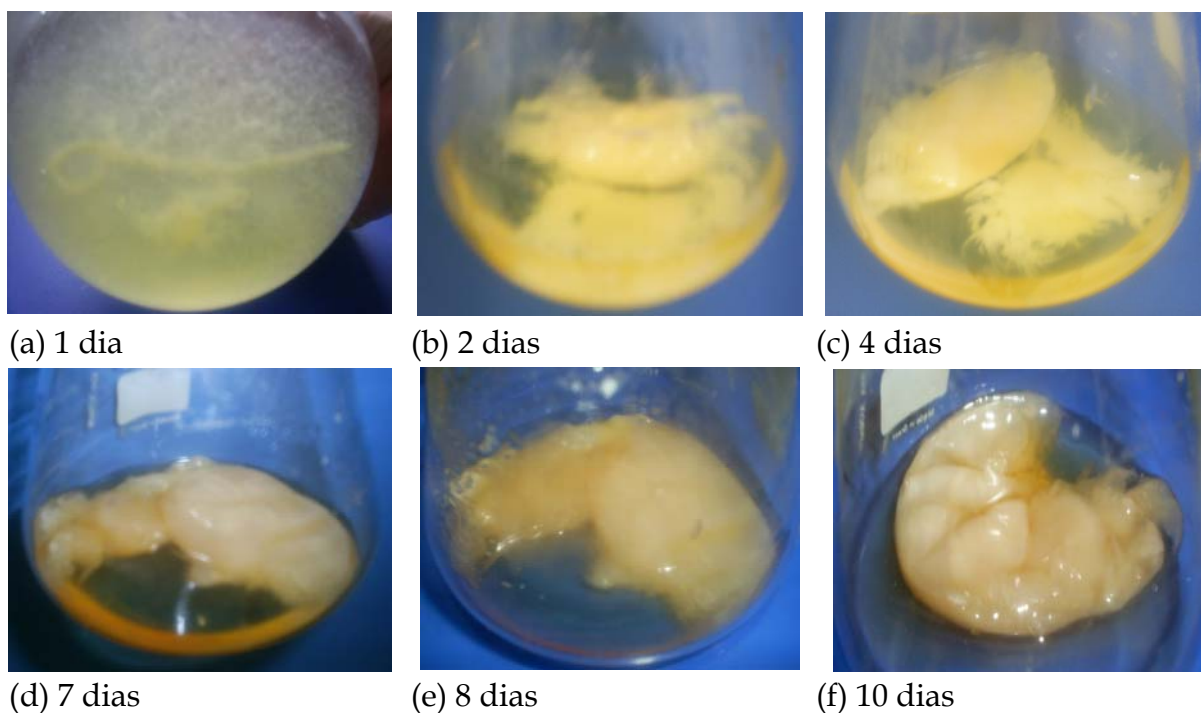


Figura 6.3 - Evolução da formação do compósito HCB-ACE produzido por *G. hansenii* em agitador orbital, quando a adição de acemanana foi de 0,6 g·l⁻¹.

6.3.3 Caracterização do compósito HCB-ACE

6.3.3.1 Morfologia da microestrutura de amostras do compósito HCB-ACE

As estruturas morfológicas da CB produzidas com e sem adição de acemanana, HCB-3D e HCB-ACE respectivamente, são apresentadas nas micrografias de MEV da Figura 6.4.

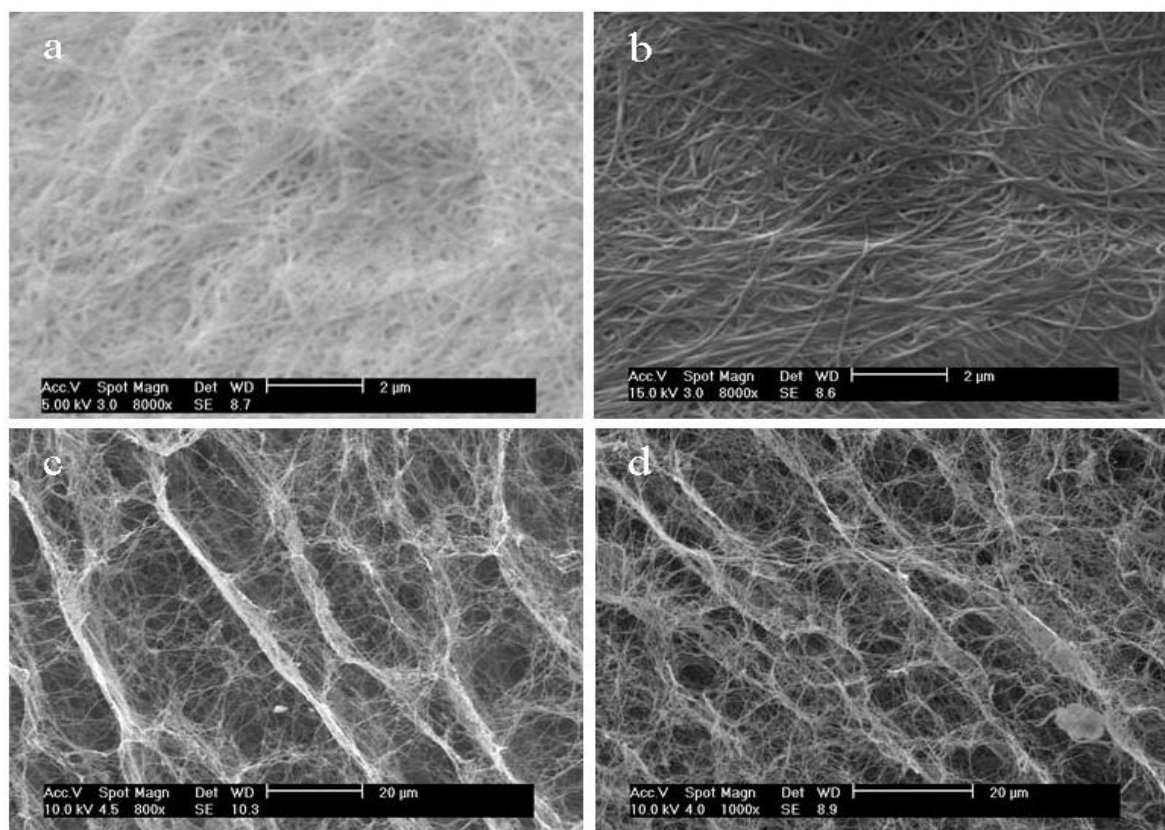


Figura 6.4 - Micrografia de MEV de amostras liofilizadas da estrutura HCB-3D e do compósito HCB-ACE. (a) Superfície da estrutura HCB-3D, ampliação 8000×. (b) Superfície da estrutura HCB-ACE, ampliação 8000×. (c) HCB-3D corte longitudinal, ampliação 800× e (d) HCB-ACE corte longitudinal, ampliação 1000×.

Os resultados mostram que a estrutura consiste de uma rede muito densa de fibras. Observações mais detalhadas das micrografias revelam algumas diferenças entre as estruturas. O diâmetro das fibras de HCB-3D é menor do que os das fibras

de HCB-ACE. Em HCB-3D as fibras possuem um diâmetro médio de 110 nm e em HCB-ACE cerca de 130 nm. O aumento na espessura pode ter sido provocado pela incorporação da acemanana nas fibras de celulose durante o processo de cristalização. A espessura das fibras influencia nas propriedades da CB, tais como capacidade de retenção de água, viscosidade e propriedades mecânicas (Mantanis *et al.*, 1995). A estrutura de HCB-ACE aparenta estar recoberta por uma camada que provoca uma oclusão da porosidade interfibrilar.

Diferenças também foram observadas analisando-se o diâmetro e a densidade dos poros. Na amostra da Figura 6.4a o diâmetro médio dos poros é aproximadamente 250 nm, e a porosidade em torno de 50%. Já na amostra da Figura 6.4b, o diâmetro médio dos poros é de aproximadamente 200 nm, e a porosidade em torno de 44%.

A Figura 6.4c e a Figura 6.4d apresentam micrografias de um corte longitudinal de amostras liofilizadas da estrutura HCB-3D e do compósito HCB-ACE, respectivamente. Em ambas as amostras pode-se observar que a estrutura é constituída por nervuras reticuladas. Em HCB-ACE (Figura 6.4d) as nervuras não são tão evidentes quanto em HCB-3D e, observa-se maior densidade de fibras entrelaçadas.

A Figura 6.5 mostra um esquema ilustrando o processo de formação do compósito HCB-ACE, que inclui a incorporação da acemanana entre as fibras de celulose durante o processo de cristalização, como também sobre as fibras. A acemanana depositada entre as fibras provoca uma desordem na cristalização produzindo regiões amorfas. Isto pode ser evidenciado pela análise de difração de raios X e FTIR, que mostram alterações morfológicas e menor grau de cristalinidade do compósito.

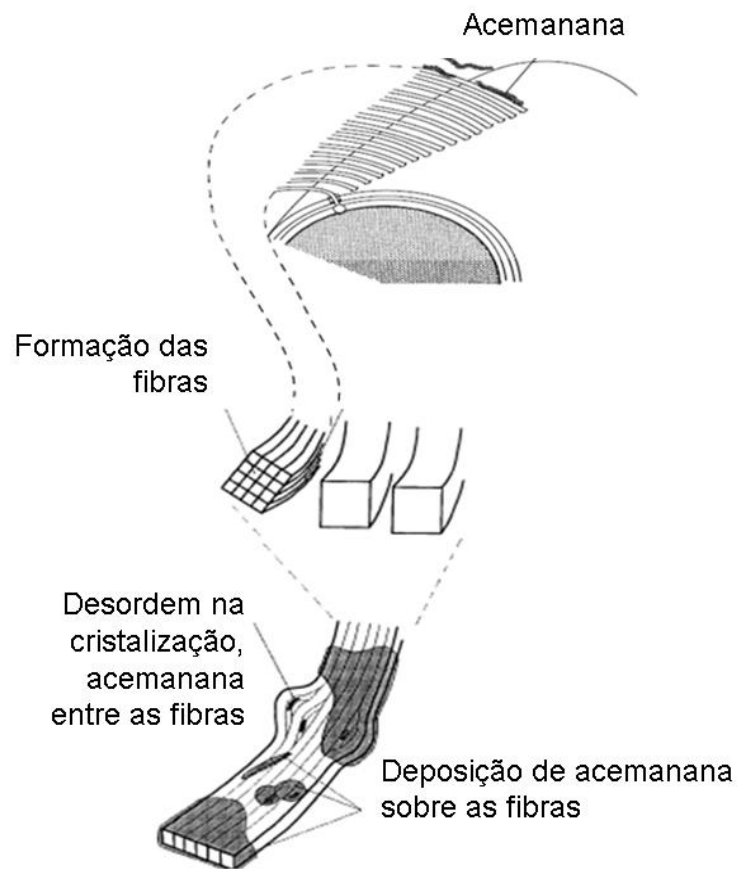


Figura 6.5 – Esquema da celulose sintetizada em meio contendo acemanana, mostrando a desordem causada na cristalização pela incorporação da acemanana entre as fibras e sobre as fibras durante o processo de cristalização. Adaptado de Tokoh e colaboradores (1998; 2002).

6.3.3.2 Difração de raios X de amostras de ACE, da estrutura tridimensional HCB-3D e do compósito HCB-ACE

Para verificar se a adição de acemanana provocou alterações nas características estruturais da HCB-3D foram realizadas análise de difração de raios X. A Figura 6.6 mostra difratogramas de raios X de amostras de ACE, HCB-ACE e HCB-3D. Os difratogramas das amostras HCB-3D e HCB-ACE apresentam os três principais picos característicos comumente atribuídos aos planos de reflexão $(1\bar{1}0)$, (110) e (200) de celulose tipo I. Comparando o difratograma HCB-ACE com o de

HCB-3D observa-se que os picos correspondentes aos planos de reflexão ($1\bar{1}0$) e (200) são similares. Entretanto, pode ser observado deslocamento no ângulo de difração dos picos dos planos ($1\bar{1}0$) e (200). Estas informações indicam a presença de regiões amorfas, causadas pela introdução da acemanana, um polímero amorfo, nas fibras de celulose. A mudança do padrão de cristalinidade ocorreu provavelmente devido a formação do compósito através de ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose e as cadeias de acemanana. Isto pode causar um aumento na distância interfibrilar e alterar a estrutura microfibrilar. O grau de cristalinidade, estimado a partir do difratograma, para a HCB-3D foi de $58\pm 5\%$ e para HCB-ACE foi de $48\pm 5\%$.

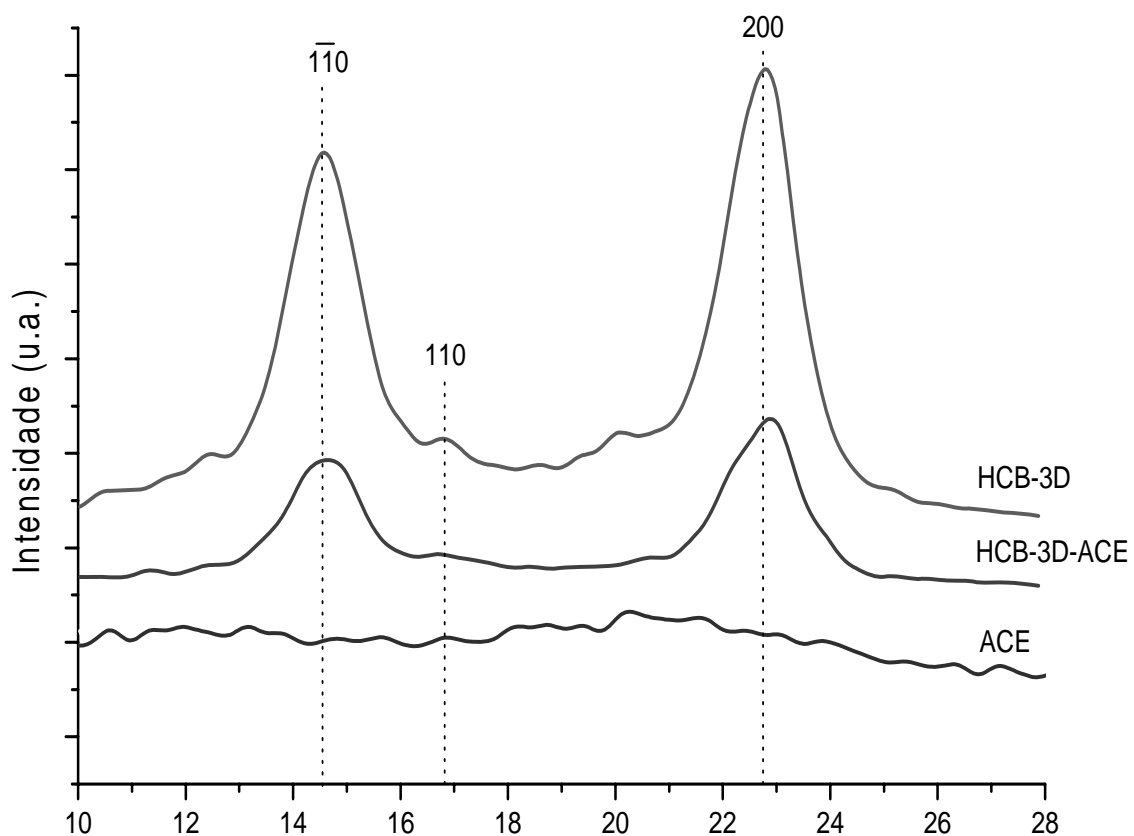


Figura 6.6 – Padrões de difração de raios X obtidos de amostras das estruturas HCB-3D, HCB-ACE e de acemanana moída.

6.3.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de amostras de ACE, do corpo HCB-3D e do compósito HCB-ACE

A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas que correspondem a determinados níveis de energia. O espectro de infravermelho permite analisar as interações e mudanças na morfologia dos componentes, uma vez que ele combina as interações químicas com a estrutura conformacional da molécula. Ele representa assim uma “impressão digital” onde cada grupamento funcional na amostra contribui de forma individual para o espectro de absorvância (Kacurakova *et al.*, 2002; Brown e Laborie, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Barud *et al.*, 2008).

A Tabela 6.2 apresenta as atribuições das principais bandas de absorção das amostras HCB-3D e HCB-ACE identificadas nos espectros de FTIR apresentados na Figura 6.7. Comparando as bandas das amostras do espectro de HCB-3D com o espectro do compósito HCB-ACE observa-se que a banda em 3378 cm^{-1} de HCB-3D, atribuída à presença de grupo hidroxila (-OH), está deslocada com relação à banda 3407 cm^{-1} do compósito HCB-ACE. Além disso, a banda em 1547 cm^{-1} do espectro HCB-3D não foi registrada no espectro do compósito HCB-ACE. Estas alterações podem ser atribuídas a interações da celulose com a acemanana, como ligações de hidrogênio ou possíveis alterações morfológicas da acemanana.

Mudança na cristalinidade do compósito HCB-ACE com relação à celulose na forma pura HCB-3D é observada pelo deslocamento da banda 2897 cm^{-1} de HCB-3D para 2885 cm^{-1} de HCB-ACE, atribuída ao estiramento de -(CH-) de grupos CH_2 e CH_3 , sugerindo uma diminuição na cristalinidade do compósito.

Tanto nas amostras de HCB-ACE quanto nas amostras de HCB-3D observa-se a banda 710 cm^{-1} característica de celulose cristalina do tipo alomórfico I_β . Estudos realizados por Czaja e colaboradores (2004) comparando a celulose bacteriana sintetizada em culturas agitadas e estáticas, mostraram que a

cristalização da celulose do tipo I_{α} foi menor do que a do tipo I_{β} produzida em cultura agitada (Czaja *et al.*, 2004). Ambas as amostras, HCB-3D e HCB-ACE foram produzidas sob culturas agitadas.

A formação do composto HCB-ACE foi confirmada pela ocorrência da banda 816 cm^{-1} no espectro do FTIR de HCB-ACE, mostrado com detalhes na Figura 6.8. Os picos de absorção característicos de glucomananas encontram na região de $800\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$ (Dumitriu, 2004); a acemanana é uma glucomanana.

Tabela 6.2 – Atribuições das principais absorções de bandas de infravermelho nas amostras HCB-3D e HCB-ACE.

Número de onda (cm^{-1})		Atribuição*
HCB-3D	HCB-ACE	
3378	3407	Grupo -OH
2921	2924	Estiramento de CH de grupos CH_2 e CH_3
2897	2885	Estiramento de CH de grupos CH_2 e CH_3
1651	1649	Estiramento C=O ou absorbância de água H-O-H
		Amido I
1547	-	Amido II
1428	1428	CH_2
1374	1375	Deformação de C-H de grupos CH_3 ou OH no plano
1337	1333	Deformação de C-H de grupos CH_3 ou OH no plano
1159	1160	C-O-C anel ligação glicosídica
1062	1062	Estiramento C-O, C-C
1029	1028	Estiramento C-O
899	898	Ligação β glicosídica entre as unidades de açúcar
-	816	Glucomanana
710	710	Celulose tipo I_{β}

*As atribuições das bandas são baseadas em informações da literatura (Helbert *et al.*, 1997; Kacurakova *et al.*, 2002; Czaja *et al.*, 2004; Dumitriu, 2004; Brown e Laborie, 2007; Watanabe *et al.*, 2007; Barud *et al.*, 2008).

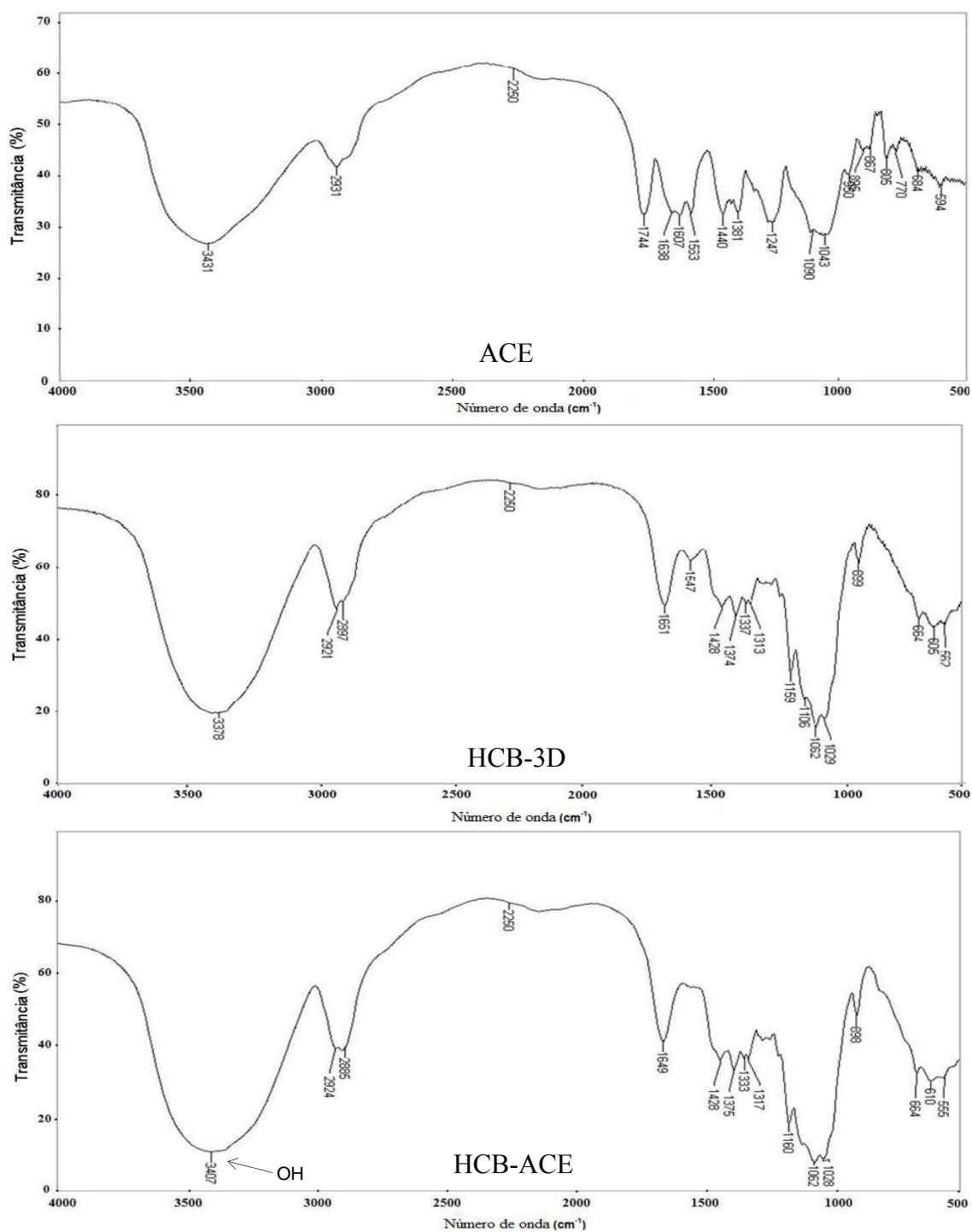


Figura 6.7 - Espectros na região do infravermelho de amostras de acemanana moída (ACE), da estrutura tridimensional hidrogel de celulose bacteriana (HCD-3D) e do compósito hidrogel celulose bacteriana e acemanana (HCB-ACE).

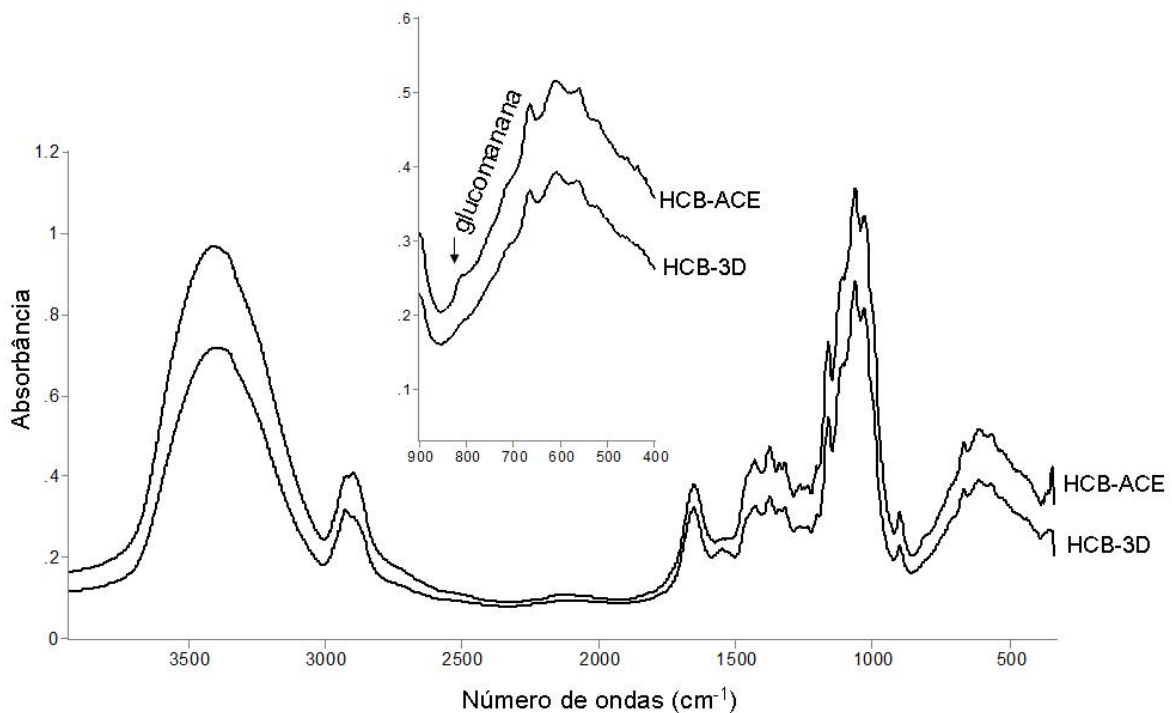


Figura 6.8 - Espectros na região do infravermelho de amostras da estrutura tridimensional hidrogel de celulose bacteriana (HCB-3D) e do compósito hidrogel celulose bacteriana e acemanana (HCB-ACE). O detalhe mostra a banda 816 cm⁻¹ do espectro HCB-ACE, características de glucomanana.

6.4 Conclusões

Neste estudo foram realizados experimentos para produzir um hidrogel compósito constituído de celulose bacteriana e acemanana (HCB-ACE). A celulose foi sintetizada utilizando a bactéria *Gluconacetobacter hansenii* em meio de cultivo suplementado com acemanana, um polissacarídeo extraído da planta *Aloe barbadensis* Miller (babosa). Os compósitos são obtidos em estruturas gelatinosas tridimensionais macroscópicas, quando devidamente cultivados em agitadores orbitais. Para caracterizar os compósitos foram utilizadas técnicas de difração de raios X, MEV e FTIR.

Nos ensaios realizados obteve-se um compósito HCB-ACE, utilizando-se o manitol como principal fonte de carbono, além da acemanana. O melhor rendimento foi obtido quando se utilizou $0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de acemanana, obtendo-se uma massa de $6,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Em concentração de acemanana maior que $0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ observou-se redução na produção do compósito.

A celulose aparentemente atua como um suporte para a adsorção de acemanana, resultando numa conformação fibrilar compósita. A interação celulose-acemanana provoca aparentemente perturbação na organização das fibras de celulose. A CB sintetizada na presença de acemanana reduz sua cristalinidade.

A análise de amostras do compósito por FTIR sugere que a incorporação da acemanana na rede celulósica produz interação entre os dois polímeros através de ligações de hidrogênio intermolecular e, conseqüentemente, provoca alterações morfológicas na celulose nativa. A ocorrência da banda 816 cm^{-1} no espectro HCB-ACE comprova a formação do compósito HCB-ACE, uma vez que os picos de absorção característicos de glucomananas encontram-se na região de 800 a 900 cm^{-1} ; a acemanana é uma glucomanana.

Este novo biomaterial apresenta grande potencial para aplicações diversas na área biomédica, aliando as características especiais da celulose bacteriana às atividades biológicas reportadas para a acemanana. Desta forma, é possível propor a construção de dispositivos de implante bioativos a partir deste compósito.

Capítulo 7

Compósito Hidrogel de Celulose

Bacteriana-Hidroxiapatita

Resumo

Compósito multicamadas de hidrogel constituído de celulose bacteriana e hidroxiapatita foi sintetizado pelo método biomimético, que consiste em produzir um material com propriedades que imitam o biomaterial natural. O hidrogel de celulose bacteriana (HCB) foi imerso em solução de CaCl_2 , seguido de imersão em solução de Na_2HPO_4 . A razão Ca:P foi determinada como 1,37, por espectroscopia de energia dispersiva. A morfologia e a distribuição de partículas de hidroxiapatita na HCB foram avaliadas por MEV. Foi observado que a hidroxiapatita foi depositada na superfície e está homogeneamente distribuída nas nanofibras de celulose. O biomaterial compósito desenvolvido apresenta estrutura interna e propriedades da superfície adequada para serem utilizados em construções de engenharia de tecidos ósseos.

7.1 Introdução

Nanofibras de celulose bacteriana (CB) têm se mostrado um material biológico versátil, com excelentes propriedades para construção de arcabouços para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa; por outro lado, a hidroxiapatita (HAp) tem sido utilizada como biomaterial em diversas aplicações biomédicas, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteoindução.

A CB tem sido utilizada recentemente como molde para a síntese biomimética de nanocristais de hidroxiapatita (Ekholm *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2006; Hutchens *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2007). A CB e a HAp quando expostas a ambientes biológicos promovem a adesão, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular (Fricain *et al.*, 2002).

A biomineralização é um processo natural para a formação de ossos e dentes em seres humanos e animais. O método biomimético para recobrimento de materiais com fosfato de cálcio é inspirado por esse processo e consiste em um processo pelo qual uma camada biologicamente ativa da apatita é formada em uma superfície através de imersão em solução artificial super-saturada de cálcio e fosfato (Liu *et al.*, 2002).

A apatita biológica, principal componente inorgânico de tecidos duros humanos, é um fosfato de cálcio não estequiométrico, que permite variações em sua composição e apresenta um déficit de cálcio em relação à hidroxiapatita estequiométrica. A HAp é constituída somente de fosfatos de cálcio termodinamicamente estáveis em soluções aquosas com o pH maior que 4,2. Apatita deficiente de cálcio pode ser usada como precursor do componente inorgânico da apatita biológica (Vallet-Regi *et al.*, 1997), uma vez que a formação de HAp envolve uma nucleação inicial com subsequente crescimento de cristais (Hong *et al.*, 2006).

Neste trabalho foram desenvolvidas e caracterizadas estruturas em forma de hidrogel multicamadas constituídas de celulose bacteriana e hidroxiapatita (HCB-HAp), visando à obtenção de um material compósito constituído de uma matriz porosa com propriedades adequadas para ser utilizado como um material biomimético para regeneração de tecidos ósseos.

7.2 Materiais e métodos

7.2.1 Preparação do compósito HCB-HAp

Amostras de hidrogel de celulose bacteriana (HCB-3D), produzidas de acordo com os procedimentos descritos no capítulo 4, foram utilizadas para

incorporação de HAp. O método utilizado foi similar ao descrito por Hutchens e colaboradores (2006).

As amostras no estado hidratado foram incubadas por 24 h, sob agitação (2,5 Hz) a 30°C, em soluções de CaCl₂ (11 g·l⁻¹) com pH ajustado em 4,83. Subseqüentemente, as amostras foram lavadas com água deionizada e novamente incubadas por mais 24 h, sob as mesmas condições, em solução de Na₂HPO₄ (8,52 g·l⁻¹), com pH ajustado em 8,36. Foram realizados cinco ciclos de incubação. As amostras foram secas em estufa a 60°C até massa constante para a determinação da massa seca.

A caracterização do compósito HCB-HAp por MEV seguiu os mesmos procedimentos descritos no item 3.2. A análise dos elementos químicos no compósito foi realizada através de espectroscopia por dispersão de energia (EDS).

7.3 Resultados

7.3.1 Produção do compósito HCB-HAp

A CB produzida pela bactéria *G. hansenii* é um gel homogêneo, resistente, contendo aproximadamente 99% de água. A Figura 7.1a mostra uma fotografia da estrutura tridimensional de HCB-3D na forma de hidrogel natural. Esta estrutura foi produzida pelo cultivo de *G. hansenii* em condições agitadas, durante 12 dias. As dimensões da estrutura na forma de hidrogel natural variam de acordo com o volume do frasco utilizado e o volume do meio de cultivo. As dimensões da estrutura mostrada na Figura 7.1a são: eixo maior = 13 cm; eixo menor = 6 cm, altura = 2,5 cm. A Figura 7.1b mostra uma fotografia da estrutura HCB-HAp na forma de hidrogel.

7.3.2 Caracterização físico-química por MEV

A morfologia de HCB-3D e do compósito HCB-HAp foi analisada através de observações de MEV. A Figura 7.1c mostra uma micrografia de MEV da superfície da estrutura hidrogel HCB-3D. Pode ser observado que o hidrogel HCB é composto por uma matriz de longas fibras densa e homogênea. A Figura 7.1d mostra uma micrografia do MEV da superfície do compósito HCB-HAp. Observe que as longas fibras foram recoberta por partículas de HAp, evidenciados também por uma superfície refletora como a mostrada na Figura 7.1b.

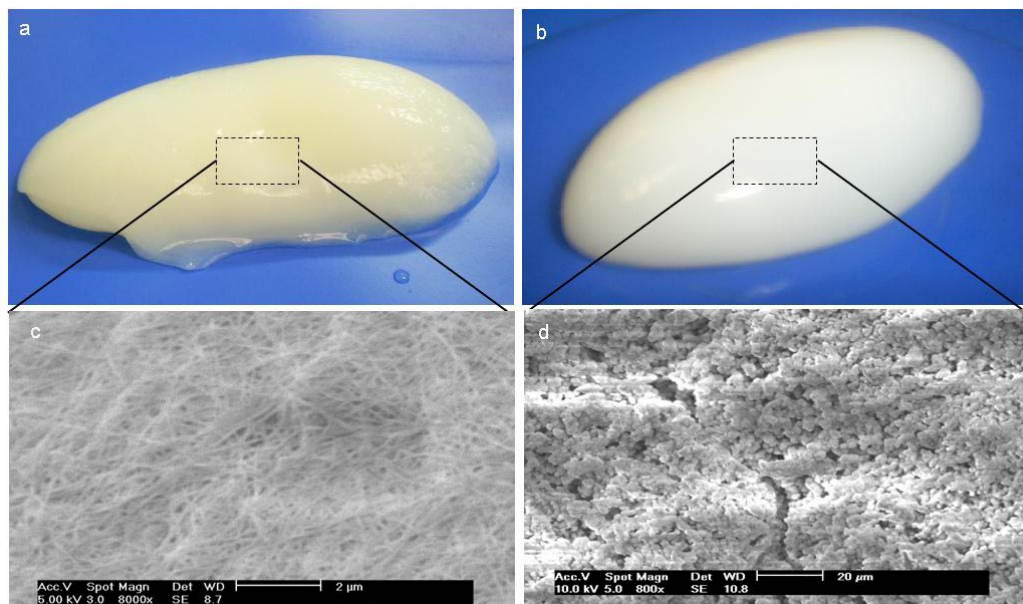


Figura 7.1 - (a) Fotografia de uma estrutura tridimensional de HCB-3D na forma de hidrogel natural. (b) fotografia do compósito de HCB-HAp na forma de hidrogel natural. (c) micrografia do MEV da superfície de HCB-3D, ampliação de 16000 \times . (d) micrografia do MEV do compósito HCB-HAp, ampliação de 800 \times .

A Figura 7.2 mostra uma seqüência de micrografias detalhando a estrutura tridimensional multicamadas do compósito HCB-HAp. A Figura 7.2a mostra uma micrografia da superfície do compósito HCB-HAp e as Figura 7.2b, Figura 7.2c, Figura 7.2d, Figura 7.2e e Figura 7.2f mostram diferentes micrografias da fratura do compósito HCB-HAp, evidenciando os detalhes da microestrutura

multicamadas de CB, composta por nanofibras de celulose recoberta por cristais de HAp.

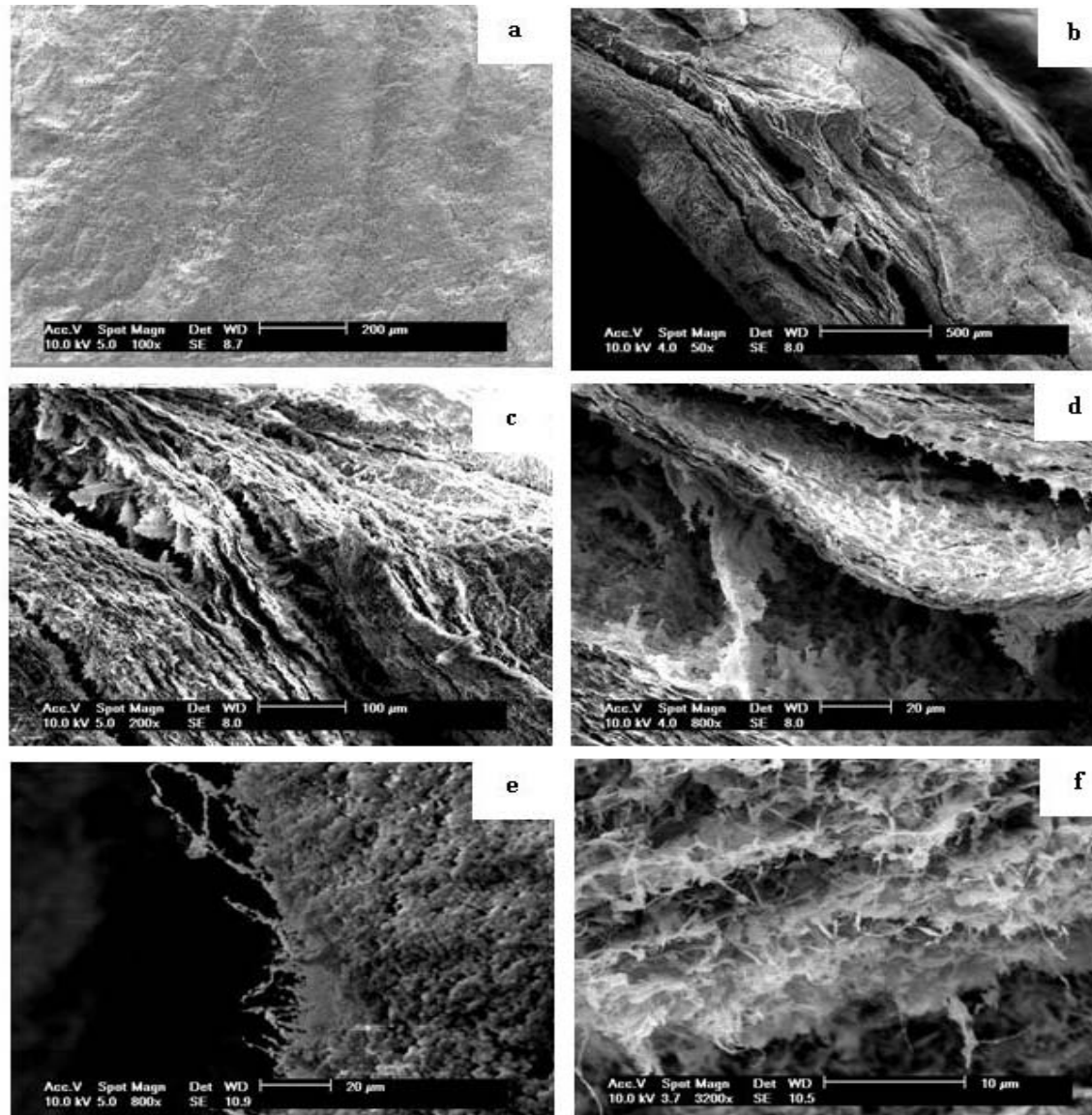


Figura 7.2 – Micrografias de MEV da microestrutura do compósito HCB-HAp. (a) Micrografia da superfície, ampliação 100×. (b), (c), (d), (e) e (f) Micrografias da fratura com detalhes das multicamadas com hidroxiapatita depositada nas fibras, com ampliações de 50×, 200×, 800×, 800× e 3200×.

7.3.3 Análise dos compostos químicos no compósito HCB-HAp

A composição química do compósito HCB-HAp foi analisada por EDS. Os resultados são mostrados na Figura 7.3, indicando a formação de uma camada rica em cálcio e fósforo. Os picos mais intensos correspondem à presença de Ca e P. A razão Ca:P foi determinado como 1,37. Grupos funcionais da superfície de materiais desempenham um papel decisivo para a modificação das propriedades da superfície (Liu *et al.*, 2002). A CB possui hidroxilas livres que podem induzir a deposição de HAp na sua superfície.

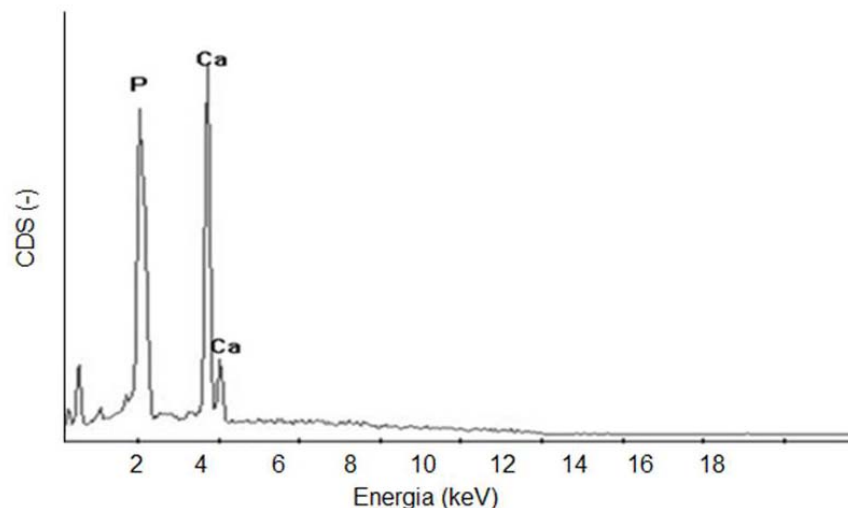


Figura 7.3 - Análise dos compostos químicos da estrutura HCB-HAp por espectrometria de energia dispersiva (EDS).

Devido às propriedades benéficas da HAp na regeneração de tecidos ósseos muitas pesquisas têm sido conduzidas no sentido de se obter materiais com características que possam aumentar a formação da HAp nos tecidos ósseos (Tanahashi e Matsuda, 1997; Liu *et al.*, 2002).

Neste estudo as estruturas tridimensionais de CB foram utilizadas para induzir o crescimento de HAp na sua superfície. Como pode ser observado na Figura 7.1a, a estrutura gelatinosa e translúcida tornou-se branca, opaca, e

aparentemente mais rígida, após ter sido submetida ao tratamento de incorporação de HAp (Figura 7.1b). A modificação da superfície da microestrutura de HCB-3D (Figura 7.1c) pode ser observada na Figura 7.1d; a estrutura constituída de uma rede de fibras foi recoberta por cristais de HAp.

A seqüência de imagens de MEV, mostradas nas Figura 7.2, evidenciam a deposição de HAp nas multicamadas. Os grupos funcionais das microfibras celulósicas da HCB-3D induziram a deposição de HAp, formando um sistema bifásico onde as fibras estão dispersas entre as partículas de HAp. Essas partículas possuem uma distribuição homogênea e estreita de tamanhos que variam entre 1 e 2 μm . O sistema hidroxiapatita-fibras celulósicas pode conferir uma maior resistência mecânica ao biocompósito.

A análise de EDS mostrou que a razão Ca:P de 1,37 foi menor que a razão estequiométrica característica de hidroxiapatita que é de 1,67. A hidroxiapatita preparada por precipitação de soluções aquosas normalmente resultam em menor razão Ca:P, que pode variar entre 1,33 e 1,67 (Mortier *et al.*, 1989).

A presença de Ca e P no compósito HCB-HAp analisado por EDS confirma, portanto, a deposição de hidroxiapatita no polímero celulósico.

7.4 Conclusões

Este estudo mostrou que a estrutura formada no compósito HCB-HAp é constituída de múltiplas camadas de HCB-3D na forma de hidrogel. Esta é uma estrutura com potencial para a mineralização biomimética de hidroxiapatita na sua superfície de CB. As observações por MEV revelaram que ocorreu distribuição, de forma homogênea, dos cristais de hidroxiapatita na superfície de HCB-3D. O compósito desenvolvido apresenta-se como um novo material potencial para aplicações de regeneração e engenharia de tecidos de ósseos.

Capítulo 8

**Conclusões Finais e Sugestões para
Futuros Trabalhos**

8.1 Conclusões finais

Biomateriais à base de celulose bacteriana (CB) foram desenvolvidos e produzidos na forma de membranas e corpos tridimensionais de celulose pura e combinada com acemanana e hidroxiapatita.

Membranas de nanofibras de celulose bacteriana com tamanho e forma de poros controlados foram produzidas de acordo com condições específicas, utilizando a bactéria *G. hansenii* e moldes adequados para formar poros de tamanho variado. O método desenvolvido permitiu a produção de membranas com poros distribuídos uniformemente e com diâmetro de 60 e 300 μm . Como o diâmetro dos poros determina as aplicações possíveis, poros seletivos para fibroblastos, na faixa estudada, podem auxiliar na recuperação de tecidos, em especial de pele humana. As membranas produzidas possuem macro e microestrutura apropriada para serem utilizadas em aplicações de regeneração de pele e de tecido cartilaginoso, devido à sua rede de nanofibras que podem promover o crescimento de células, melhorar a oxigenação do tecido e atrasar a migração de fibroblastos, permitindo assim a recuperação da lesão.

Estruturas tridimensionais macroscópicas de celulose bacteriana, na forma de hidrogel, foram desenvolvidas pelo cultivo de *G. hansenii* sob condições de cultura agitada, utilizando manitol como fonte de carbono, obtendo-se uma concentração máxima de celulose de 7 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. As estruturas produzidas são constituídas por uma massa gelatinosa envolvida por uma densa membrana. A velocidade de agitação e a razão entre volume do frasco e o volume do meio de cultivo influenciam na formação das estruturas HCB-3D e na produção de celulose. A análise da microestrutura revelou que tanto a massa gelatinosa do interior da estrutura quanto a membrana que a reveste são constituídas por uma rede de nanofibras de celulose entrelaçadas e altamente porosa. Porém, a

densidade de fibras na membrana é muito maior que no interior da estrutura. Sugere-se que essas estruturas possuem características físico-químicas apropriadas para aplicação como material de implantes de preenchimento, próteses de tecido cartilaginoso e ósseo, e arcabouços para engenharia de tecidos e órgãos. Opcionalmente, essas estruturas poderiam ser utilizadas para liberação controlada de fármacos.

As estruturas tridimensionais em forma de hidrogel de celulose podem ser vascularizadas, isto é, pode-se criar canais na estrutura 3D em torno de moldes previamente definidos. O diâmetro dos canais é determinado em função do molde utilizado. A avaliação da microestrutura mostrou que a superfície dos canais é constituída por uma densa membrana de nanofibras de celulose entrelaçadas, similar à membrana que reveste a estrutura. A região que sobrepõe os canais é constituída de uma estrutura celular também de nanofibras de celulose. Sugere-se que essas estruturas possuam características físico-químicas apropriadas para, por exemplo, serem aplicadas como material para testes e diagnósticos de resposta celular (endotelial e muscular lisa) a lesões causadas por implantes de endopróteses vasculares (*stents*).

Um compósito hidrogel, constituído de celulose bacteriana e acemanana, foi desenvolvido com sucesso através do cultivo de *G. hansenii* em meio suplementado com acemanana. O rendimento máximo obtido foi de $6,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ do compósito quando se utilizou $0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de acemanana. A interação celulose-acemanana provoca aparentemente perturbação na organização das fibras de celulose. A CB sintetizada na presença de acemanana reduziu a sua cristalinidade, devido à incorporação da acemanana na rede de fibras celulósicas, produzindo dessa forma regiões amorfas. A análise de amostras do compósito por FTIR sugere que a incorporação da acemanana nas cadeias de celulose produz interação entre os dois polímeros através de ligações de hidrogênio intermolecular e, conseqüentemente, provoca alterações morfológicas na celulose nativa. A ocorrência da banda 816 cm^{-1} no espectro HCB-ACE mostra que houve a

formação do compósito HCB-ACE, uma vez que os picos de absorção característicos de glucomananas encontram-se na região de 800 a 900 cm^{-1} ; a acemanana é uma glucomanana. Este estudo mostrou que é possível a obtenção de um biomaterial compósito constituído de celulose bacteriana e acemanana. Estes compósitos são obtidos em estruturas gelatinosas tridimensionais macroscópicas quando cultivados em condições apropriadas, definidas neste trabalho. Este novo biomaterial, nunca antes reportado, apresenta grande potencial para aplicações diversas na área biomédica, porque alia as características especiais da celulose bacteriana com propriedades bioativas da acemanana.

A estrutura hidrogel tridimensional de CB também foi utilizada com sucesso para a síntese biomimética da hidroxiapatita. As observações por MEV revelaram que ocorreu distribuição, de forma homogênea, dos cristais de hidroxiapatita na superfície da estrutura HCB-3D. O compósito desenvolvido pode ser explorado como um novo material para aplicações de engenharia de tecidos e de regeneração óssea.

8.2 Sugestões de trabalhos futuros

- Realização de ensaios bioológicos *in vitro* e *in vivo* dos biomateriais produzidos;
- Caracterizações quantitativas dos compostos dos biomateriais produzidos;
- Estudos com moldes para a obtenção de vasos com ramificações nas estruturas tridimensionais;
- Estudo da influência de diferentes condições de esterilização (temperatura, pressão e tempo) nas propriedades do compósito HCB-3D-ACE.

Referências

- ARAÚJO, P. S.; SILVA, J. M. O. D.; NECKEL, C., A.; IANSSEN, C.; OLTRAMARI, A. C.; PASSOS, R.; TIEPO, E.; BACH, D. B.; MARASCHIN, M. Micropropagação de babosa (*Aloe vera* - Liliaceae). *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.25, p.54-57 1999.
- AUSMEES, N.; MAYER, R.; WEINHOUSE, H.; VOLMAN, G.; AMIKAM, D.; BENZIMAN, M.; LINDBERG, M. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiology Letters*, v.204, n.1, p.163-7. 2001.
- BACKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; JOHANSSON, B. R.; RISBERG, B.; GATENHOLM, P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, v.27, n.9, p.2141-2149. 2006.
- BARUD, H. S.; DE ARAUJO, A. M.; SANTOS, D. B.; DE ASSUNCAO, R. M. N.; MEIRELES, C. S.; CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES, G.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Thermal behavior of cellulose acetate produced from homogeneous acetylation of bacterial cellulose. *Thermochimica Acta*, v.471, n.1-2, p.61-69. 2008.
- BODIN, A.; CONCARO, S.; BRITTBURG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v.1, n.5, p.406-8. 2007.
- BORZANI, W.; DESOUSA, S. J. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid-media. *Biotechnology Letters*, v.17, n.11, p.1271-1272. 1995.
- BROWN, A. J. An acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society*, v.49, p.432-439. 1886.
- BROWN, E. E.; LABORIE, M. P. Bioengineering bacterial cellulose/poly(ethylene oxide) nanocomposites. *Biomacromolecules*, v.8, n.10, p.3074-81. 2007.
- BROWN JR., M. R. Microbial Cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products
(www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown), Position Paper, 1998a.

BROWN JR., M. R. Movies cellulose biosynthesis by *Acetobacter xylinum*. <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/movies/movies.htm> nov 25 2008. 1998b.

BROWN, R. M., JR.; HAIGLER, C. H.; SUTTIE, J.; WHITE, A. R.; ROBERTS, E.; SMITH, C.; ITOH, T.; COOPER, K. Biosynthesis and degradation of cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, p. 33-78. 1983.

BROWN, R. M., JR.; WILLISON, J. H.; RICHARDSON, C. L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, v.73, n.12, p.4565-9. 1976.

BROWN, R. M.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science.*, v.1, n.5, p.149-156. 1996.

BUNGAY, H. R.; SERAFICA, G. C. Production of microbial cellulose using a rotating disk film bioreactor. World Intellectual Property Organization, patent number 97005271. 1997.

CAMPESTRINI, L. H. *Aloe barbadensis* Miller: Análise do perfil metabólico e estudos dos efeitos vasculogênicos e angiogênicos do extrato do parênquima de reserva, da fração polissacarídica (Fp) e da acemanana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007. 205 p.

CHANG, A. L.; TUCKERMAN, J. R.; GONZALEZ, G.; MAYER, R.; WEINHOUSE, H.; VOLMAN, G.; AMIKAM, D.; BENZIMAN, M.; GILLES-GONZALEZ, M. A. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry*, v.40, n.12, p.3420-6. 2001.

CHOW, J. T. N.; WILLIAMSON, D. A.; YATES, K. M.; GOUX, W. J. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of *Aloe vera* L. *Carbohydrate Research*, v.340, n.6, p.1131-1142. 2005.

CIECHAŃSKA, D. Multifunctional bacterial cellulose/chitosan composite materials for medical applications. *FIBRES & TEXTILES in Eastern Europe*, v.12, n.4, p.48. 2004.

COUCHERON, D. H. An *Acetobacter xylinum* insertion sequence element associated with inactivation of cellulose production. *Journal of Bacteriology*, v.173, n.18, p.5723-31. 1991.

- CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M., JR. Microbial cellulose the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, v.27, n.2, p.145-51. 2006.
- CZAJA, W.; ROMANOVICZ, D.; BROWN, R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*, v.11, n.3-4, p.403-411. 2004.
- CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN, R. M. The Future Prospects of microbial cellulose in biomedical Applications. *Biomacromolecules*, v.8, n.1, p.1-12. 2007.
- DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.50, n.1, p.245-276. 1999.
- DEWULF, P.; JORIS, K.; VANDAMME, E. J. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconate synthesis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.67, n.4, p.376-380. 1996.
- DIEHL, B.; TEICHMULLER, E. E. *Aloe vera*, quality inspection and identification. *Agro Food Industry Hi-Tech*, v.9, n.1, p.14-16. 1998.
- DJERABA, A.; QUERE, P. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *International Journal of Immunopharmacology*, v.22, n.5, p.365-372. 2000.
- DROTLEFF, S.; LUNGWITZ, U.; BREUNIG, M.; DENNIS, A.; BLUNK, T.; TESSMAR, J.; GOPFERICH, A. Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, n.2, p.385-407. 2004.
- DUDMAN, W. F. Cellulose production by *Acetobacter* strains in submerged culture. *J Gen Microbiol*, v.22, p.25-39. 1960.
- DUMITRIU, S., Ed. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility: CRC Press p.1204, 2 ed. 2004.
- EKHOLM, E.; TOMMILA, M.; FORSBACK, A. P.; MARTSON, M.; HOLMBOM, J.; AARITALO, V.; FINNBERG, C.; KUUSILEHTO, A.; SALONEN, J.; YLI-URPO, A.; PENTTINEN, R. Hydroxyapatite coating of cellulose sponge does not improve its osteogenic potency in rat bone. *Acta Biomaterialia*, v.1, n.5, p.535-44. 2005.

- ERENO, D. Celulose na pele. Bactéria produz substância usada para tratar queimaduras e no revestimento de coletes à prova de balas. *Revista Pesquisa Fapesc*, v. 101, 2004.
- FEDOROVICH, N. E.; ALBLAS, J.; DE WIJN, J. R.; HENNINK, W. E.; VERBOUT, A. J.; DHERT, W. J. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state of the art and novel application in organ printing. *Tissue Engineering*, v.13, n.8, p.1905-25. 2007.
- FEMENIA, A.; SANCHEZ, E. S.; SIMAL, S.; ROSSELLO, C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate Polymers*, v.39, n.2, p.109-117. 1999.
- FONTANA, J. D.; DE SOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DE SOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*, v.24-25, p.253-64. 1990.
- FRICAIN, J. C.; GRANJA, P. L.; BARBOSA, M. A.; DE JESO, B.; BARTHE, N.; BAQUEY, C. Cellulose phosphates as biomaterials. *In vivo* biocompatibility studies. *Biomaterials*, v.23, n.4, p.971-80. 2002.
- GALPERIN, M. Y. The Molecular Biology Database Collection: 2005 update. *Nucleic Acids Research*, v.33, p.D5-24. 2005.
- GALPERIN, M. Y.; NIKOLSKAYA, A. N.; KOONIN, E. V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *Fems Microbiology Letters*, v.203, n.1, p.11-21. 2001.
- GARAS, S. M.; HUBER, P.; SCOTT, N. A. Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions. *Pharmacology & Therapeutics*, v.92, n.2-3, p.165-78. 2001.
- GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHYA, S. N.; JAGANNATH, J. H.; BAWA, A. S. Characterization of chemically treated bacterial (*Acetobacter xylinum*) biopolymer: Some thermo-mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules* v.37, n.4, p.189-194 2005a.
- GEORGE, J.; RAMANA, K. V.; SABAPATHYA, S. N.; JAGANNATH, J. H.; BAWA, A. S. Physico-mechanical properties of chemically treated bacterial

- (*Acetobacter xylinum*) cellulose membrane. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.21, n.8-9, p.1323-1327. 2005b.
- GOMEZ-CARRACEDO, A.; ALVAREZ-LORENZO, C.; GOMEZ-AMOZA, J. L.; CONCHEIRO, A. Glass transitions and viscoelastic properties of carbopol and noveon compacts. International Journal of Pharmaceutics, v.274, n.1-2, p.233-43. 2004.
- GRANJA, P. L.; BARBOSA, M. A.; POUYS; EACUTE; GU, L.; DE, J.; EACUTE; SO, B.; ROUAIS, F.; BAQUEY, C. Cellulose phosphates as biomaterials. Mineralization of chemically modified regenerated cellulose hydrogels. Journal of Materials Science, v.36, p.2163-2172. 2001.
- GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities. Science, v.295, n.5557, p.1009-14. 2002.
- GROMET, Z.; SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 4. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. Biochem J, v.67, n.4, p.679-89. 1957.
- GUNATILLAKE, P.; MAYADUNNE, R.; ADHIKARI, R. Recent developments in biodegradable synthetic polymers. Biotechnol Annu Rev, v.12, p.301-47. 2006.
- HAIGLER, C. H.; BROWN, R. M., JR.; BENZIMAN, M. Calcofluor white ST alters the *in vivo* assembly of cellulose microfibrils. Science, v.210, n.4472, p.903-6. 1980.
- HAIGLER, C. H.; WHITE, A. R.; BROWN, R. M.; COOPER, K. M. Alteration of *in vivo* cellulose ribbon assembly by carboxymethylcellulose and other cellulose derivatives. Journal of Cell Biology, v.94, n.1, p.64-69. 1982.
- HARTGERINK, J. D.; BENIASH, E.; STUPP, S. I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. Science, v.294, n.5547, p.1684-1688. 2001.
- HELBERT, W.; SUGIYAMA, J.; ISHIHARA, M.; YAMANAKA, S. Characterization of native crystalline cellulose in the cell walls of oomycota. Journal of Biotechnology, v.57, n.1-3, p.29-37. 1997.
- HELENIUS, G.; BACKDAHL, H.; BODIN, A.; NANNMARK, U.; GATENHOLM, P.; RISBERG, B. *In vivo* biocompatibility of bacterial cellulose. Journal of Biomedical Materials Research Part A, v.76A, n.2, p.431-438. 2006.

- HEO, M. S.; SON, H. J. Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.36, n.Pt 1, p.41-5. 2002.
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, v.58, n.2, p.345-52. 1954.
- HONG, L.; WANG, Y. L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; GAO, C.; WAN, Y. Z. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. *Materials Letters*, v.60, n.13-14, p.1710-1713. 2006.
- HUTCHENS, S. A.; BENSON, R. S.; EVANS, B. R.; O'NEILL, H. M.; RAWN, C. J. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials*, v.27, n.26, p.4661-70. 2006.
- HUTCHENS, S. A.; LEON, R. V.; O'NEILL H, M.; EVANS, B. R. Statistical analysis of optimal culture conditions for *Gluconacetobacter hansenii* cellulose production. *Letters in Applied Microbiology*, v.44, n.2, p.175-80. 2007.
- HWANG, J. W.; YANG, Y. K.; HWANG, J. K.; PYUN, Y. R.; KIM, Y. S. Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.88, n.2, p.183-188. 1999.
- JONAS, R.; FARAH, L. F. Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, v.59, n.1-3, p.101-106. 1998.
- JUNG, J. Y.; PARK, J. K.; CHANG, H. N. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in an agitated culture without living non-cellulose producing cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, n.3, p.347-354. 2005.
- KACURAKOVA, 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*, v.337, n.12, p.1145-53. 2002.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, v.28, n.1, p.27-30. 2000.
- KING, G. K.; YATES, K. M.; GREENLEE, P. G.; PIERCE, K. R.; FORD, C. R.; MCANALLEY, B. H.; TIZARD, I. R. The Effect of acemannan immunostimulant in combination with surgery and radiation-therapy on spontaneous canine and feline

- fibrosarcomas. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.31, n.5, p.439-447. 1995.
- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESSLER, N.; HORNING, M.; SCHMAUDER, H. P.; MARSCH, S. Nanocelluloses as innovative polymers in research and application. *Polysaccharides II*, v.205, p.49-96. 2006.
- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Progress in Polymer Science*, v.26, p.1561-1603. 2001.
- KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, v.24, n.13, p.2161-75. 2003.
- KORNMANN, H.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P.; MARISON, I.; VON STOCKAR, U. Influence of residual ethanol concentration on the growth of *Gluconacetobacter xylinus* I 2281. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.62, n.2-3, p.168-73. 2003.
- KOUDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.83, n.4, p.371-376. 1997.
- KRAMER, F.; KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; HEßLER, N.; WESARG, F.; FRIED, W.; STADERMANN, D. Nanocellulose polymer composites as innovative pool for (Bio)Material Development. *Macromolecular Symposia.*, v.244, p.136-148. 2006.
- KRYSTYNOWICZ, A.; CZAJA, W.; WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A.; GONCALVES-MISKIEWICZ, M.; TURKIEWICZ, M.; BIELECKI, S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.29, n.4, p.189-95. 2002.
- LANGER, R. Tissue engineering. *Molecular Therapy*, v.1, n.1, p.12-5. 2000.
- LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering. *Science*, v.260, n.5110, p.920-926. 1993.
- LANZER, P.; STERNBERG, K.; SCHMITZ, K. P.; KOLODGIE, F.; NAKAZAWA, G.; VIRMANI, R. Drug-eluting coronary stent very late thrombosis revisited. *Herz*, v.33, n.5, p.334-342. 2008.

- LEE, J. K.; LEE, M. K.; YUN, Y. P.; KIM, Y.; KIM, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, K.; HAN, S. S.; LEE, C. K. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *International Immunopharmacology*, v.1, n.7, p.1275-1284. 2001.
- LEE, J. W.; DENG, F.; YEOMANS, W. G.; ALLEN, A. L.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. L. 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, n.9, p.3970-5. 2001.
- LILLARD, J. W., JR.; BEARDEN, S. W.; FETHERSTON, J. D.; PERRY, R. D. The haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is not essential for the pathogenesis of bubonic plague in mammals. *Microbiology*, v.145 (Pt 1), p.197-209. 1999.
- LIU, Q.; DING, J.; MANTE, F. K.; WUNDER, S. L.; BARAN, G. R. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: a self-assembled monolayer technique. *Biomaterials*, v.23, n.15, p.3103-11. 2002.
- MANTANIS, G. I.; YOUNG, R. A.; ROWELL, R. M. Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids. *Cellulose* v.2, n.1. 1995.
- MASAOKA, S.; OHE, T.; SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.75, n.1, p.18-22. 1993.
- MCANALLEY, B. H.; CARPENTER, R. H.; MCDANIEL, H. R. Wound healing accelerated by systemic administration of polysaccharide from *Aloe vera*. United States Patent, Patent number 5,468,737, 1995.
- MELLO, L. R.; FELTRIN, L. T.; FONTES NETO, P. T.; FERRAZ, F. A. Duraplasty with biosynthetic cellulose: an experimental study. *Journal of Neurosurgery*, v.86, n.1, p.143-50. 1997.
- MELLO, L. R.; FELTRIN, Y.; SELBACH, R.; MACEDO JUNIOR, G.; SPAUTZ, C.; HAAS, L. J. Uso da celulose liofilizada em lesões de nervos periféricos com perda de substância. *Arquivos Neuro psiquiatria*, v.59, n.2-B, p.372-379. 2001.

- MINUTH, W. W.; SITTINGER, M.; KLOTH, S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell and Tissue Research*, v.291, n.1, p.1-11. 1998.
- MORTIER, A.; LEMAITRE, J.; RODRIQUE, L.; ROUXHET, P. G. Synthesis and thermal-behavior of well-crystallized calcium-deficient phosphate apatite. *Journal of Solid State Chemistry*, v.78, n.2, p.215-219. 1989.
- NEGRÃO, S. W.; BUENO, R. R. L.; GUÉRIOS, E. E.; ULTRAMARI, F. T.; FAIDIGA, A. M.; ANDRADE, P. M. P.; NERCOLINI, D. C.; TARAŠTCHUCK, J. C.; FARAH, L. F. A eficácia do stent recoberto com celulose biossintética comparado ao stent convencional em angioplastia em coelhos. *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva*, v.14, n.1, p.10-19. 2006.
- O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, v.4, p.173-207. 1997.
- OGAWA, R.; TOKURA, S. Preparation of bacterial cellulose containing N-acetylglucosamine residues. *Carbohydrate Polymers*, v.19, p.171-178. 1992.
- OIKAWA, T.; OHTORI, T.; AMEYAMA, M. Production of cellulose from D-Mannitol by *Acetobacter xylinum* Ku-1. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.59, n.2, p.331-332. 1995.
- PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. Tissue Engineering: Prentice Hall. 2003
- PAUL, R.; WEISER, S.; AMIOT, N. C.; CHAN, C.; SCHIRMER, T.; GIESE, B.; JENAL, U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes & Development*, v.18, n.6, p.715-27. 2004.
- PEI, J. M.; GRISHIN, N. V. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, v.42, n.2, p.210-216. 2001.
- PORTO, L. M.; RECOUVREUX, D. O. S.; RAMBO, C. R.; CARMINATTI, C. A.; COSTA, C. M.; ANTONIO, R. V. Corpos tridimensionais de celulose bacteriana. Processo de produção e uso dos mesmos. Depósito de pedido de patente Instituto Nacional de Propriedade Intelectual número PI0803173-8. 2008.
- RAMAMOORTHY, L.; TIZARD, I. R. Induction of apoptosis in a macrophage cell line RAW 264.7 by acemannan, a beta-(1,4)-acetylated mannan. *Molecular Pharmacology*, v.53, n.3, p.415-421. 1998.

- RAMBO, C. R.; MULLER, F. A.; MULLER, L.; SIEBER, H.; HOFMANN, I.; GREIL, P. Biomimetic apatite coating on biomorphous alumina scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, v.26, n.1, p.92-99. 2006.
- RAMBO, C. R.; RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; ANTONIO, R. V.; PORTO, L. M. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v.28, n.4, p.549-554. 2008.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan. 2001. 906 p.
- RECOUVREUX, D. O. S. Produção de celulose bacteriana: identificação do operon bcs e produção de biofilme celulósico por *Chromobacterium violaceum*. (Dissertação de mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 2004. 134 p.
- RECOUVREUX, D. O. S.; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K.; RAMBO, C. R.; PORTO, L. M.; ANTONIO, R. V. Cellulose biosynthesis by the beta-proteobacterium, *Chromobacterium violaceum*. *Current Microbiology*, v.57, n.5, p.469-476. 2008.
- RÖMLING, U. Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in Microbiology*, v.153, n.4, p.205-212. 2002.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, v.55, n.1, p.35-58. 1991.
- ROSS, P.; MAYER, R.; WEINHOUSE, H.; AMIKAM, D.; HUGGIRAT, Y.; BENZIMAN, M.; DEVROOM, E.; FIDDER, A.; DEPAUS, P.; SLIEDREGT, L. A. J. M.; VANDERMAREL, G. A.; VANBOOM, J. H. The cyclic diguanylic acid regulatory system of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* - chemical synthesis and biological-activity of cyclic-nucleotide dimer, trimer, and phosphothioate derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, v.265, n.31, p.18933-18943. 1990.
- ROSS, P.; WEINHOUSE, H.; ALONI, Y.; MICHAELI, D.; WEINBERGEROHANA, P.; MAYER, R.; BRAUN, S.; DEVROOM, E.; VANDERMAREL, G. A.; VANBOOM, J. H.; BENZIMAN, M. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic Acid. *Nature*, v.325, n.6101, p.279-281. 1987.

- SANCHEZ, J. Colorimetric assay of alditols in complex biological samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.46, n.1, p.157-160. 1998.
- SAXENA, I. M.; BROWN, R. M., JR. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Annals of Botany*, v.96, n.1, p.9-21. 2005.
- SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K.; OKUDA, K.; BROWN, R. M., JR. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *The Journal of Bacteriology*, v.176, n.18, p.5735-52. 1994.
- SCHENZEL, K.; FISCHER, S.; BRENDLER, E. New method for determining the degree of cellulose I crystallinity by means of FT Raman spectroscopy. *Cellulose*, v.12, n.3, p.223-231. 2005.
- SCHRAMM, M.; GROMET, Z.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 3. Substrates and inhibitors. *Biochemical Journal* v.67, n.4, p.669-79. 1957.
- 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, n.1, p.123-9. 1954a.
- SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. I. Micromethod for the determination of celluloses. *Biochemical Journal*, v.56, n.1, p.163-6. 1954b.
- SIQUEIRA, J. J. P. Membrana Porosa - O Progresso em Curativos. *Ética & Estética*, v.9, p.10. 2003.
- SIQUEIRA, J. J. P.; MORESCHI, J. C. Membranas de celulose porosas desidratadas para curativos em úlceras, escoriações e queimaduras. *Cirurgia Vasculiar & Angiologia* v.16, p.179. 2000.
- SON, H. J.; HEO, M. S.; KIM, Y. G.; LEE, S. J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*., v.33, n.Pt 1, p.1-5. 2001.
- SVENSSON, A.; NICKLASSON, E.; HARRAH, T.; PANILAITIS, B.; KAPLAN, D. L.; BRITTEBERG, M.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, v.26, n.4, p.419-31. 2005.

- TANAHASHI, M.; MATSUDA, T. Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.34, n.3, p.305-15. 1997.
- THOMAS, D. R.; GOODE, P. S.; LAMASTER, K.; TENNYSON, T. Acemannan hydrogel versus saline dressings for pressure ulcers: a randomized, controlled trial. *Journal of the American Geriatrics Society*, v.46, n.9, p.S45-S45. 1998.
- TOKOH, C.; TAKABE, K.; FUJITA, M.; SAIKI, H. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of acetyl glucomannan. *Cellulose*, v.5, p.249-261. 1998.
- TOKOH, C.; TAKABE, K.; SUGIYAMA, J.; FUJITA, M. Cellulose synthesized by *Acetobacter xylinum* in the presence of plant cell wall polysaccharides. *Cellulose*, v.9, n.1, p.65-74. 2002.
- TSANG, V. L.; BHATIA, S. N. Three-dimensional tissue fabrication. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, n.11, p.1635-47. 2004.
- TSUCHIDA, T.; YOSHINAGA, F. Production of bacterial cellulose by agitation culture systems. *Pure and Applied Chemistry*, v.69, n.11, p.2453-2458. 1997.
- TURNER, C. E.; WILLIAMSON, D. A.; STROUD, P. A.; TALLEY, D. J. Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. *International Immunopharmacology*, v.4, n.14, p.1727-1737. 2004.
- VALENTA, C.; AUNER, B. G. The use of polymers for dermal and transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, n.2, p.279-89. 2004.
- VALLET-REGI, M.; RODRIGUEZ-LORENZO, L. M.; SALINAS, A. J. Synthesis and characterization of calcium deficient apatite. *Solid State Ionics*, v.101-103, p.1279-1285. 1997.
- VELEMA, J.; KAPLAN, D. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.102, p.187-238. 2006.
- WAN, Y. Z.; HONG, L.; JIA, S. R.; HUANG, Y.; ZHU, Y.; WANG, Y. L.; JIANG, H. J. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-bacterial cellulose

nanocomposites. *Composites Science and Technology*, v.66, n.11-12, p.1825-1832. 2006.

WAN, Y. Z.; HUANG, Y.; YUAN, C. D.; S. RAMAN; ZHUB, Y.; JIANG, D. H. J.; HEA, F.; GAO, C. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications *Materials Science and Engineering C*, v.27, n.4, p.855-864 2007.

WATANABE, A.; MORITA, S.; OZAKI, Y. Temperature-dependent changes in hydrogen bonds in cellulose I alpha studied by infrared spectroscopy in combination with perturbation-correlation moving-window two-dimensional correlation spectroscopy: comparison with cellulose I beta. *Biomacromolecules*, v.8, n.9, p.2969-75. 2007.

WATANABE, K.; TABUCHI, M.; MORINAGA, Y.; YOSHINAGA, F. Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture. *Cellulose*, v.5, n.3, p.187-200. 1998.

WONG, H. C.; FEAR, A. L.; CALHOON, R. D.; EICHINGER, G. H.; MAYER, R.; AMIKAM, D.; BENZIMAN, M.; GELFAND, D. H.; MEADE, J. H.; EMERICK, A. W. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.87, n.20, p.8130-4. 1990.

YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.61, n.8, p.1244-51. 1997.

YAMANAKA, S.; ISHIIHARA, M.; SUGIYAMA, J. Structural modification of bacterial cellulose. *Cellulose*, v.7, n.3, p.213-225. 2000.

YAMANAKA, S.; WATANABE, K.; KITAMURA, N.; IGUCHI, M.; MITSUHASHI, S.; NISHI, Y.; URYU, M. The structure and mechanical-properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, v.24, n.9, p.3141-3145. 1989.

YANG, Y. J.; KANG, S.; XU, B.; CHEN, J. L.; QIAO, S. B.; QIN, X. W.; YAO, M.; CHEN, J.; WU, Y. J.; LIU, H. B.; YUAN, J. Q.; YOU, S. J.; LI, J. J.; DAI, J.; GAO, R. L. Short- and long-term outcomes of single bare metal stent versus drug eluting stent in nondiabetic patients with a simple de novo lesion in the middle and large vessel. *Journal of Translational Medicine*, v.6, p. 6-42. 2008.

ZHANG, L.; TIZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology*, v.35, n.2, p.119-28. 1996.